

# **VETERINÁRNÍ MEDICÍNA**

**6**

ROČNÍK 14 (XLII)  
PRAHA,  
ČERVEN 1969  
CENA 10 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ  
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

## Řídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král (předseda), prof. MVDr. Koloman Bođa, DrSc., doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr. Jaroslav Dražan, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., 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 redaktorka ing. Jovanka Václavičková

© Ústav vědeckotechnických informací, Praha 1969

■  
Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozborů 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 ветеринарной медицины. Издает Институт научно-технической информации. Выход в свет ежемесячно. Редакция Прага 2, Слезска 7.

■  
The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA published 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.

# INTRAVENÓZNÍ INFEKCE SLEPIC MYCOBACTERIUM AVIUM

K. Hejlíček, J. Ullrichová, M. Zendulka

VŠZ, veterinární fakulta, Brno

HEJLÍČEK K., ULLRICHOVÁ J., ZENDULKA M. Intravenózní infekce slepic *Mycobacterium avium*. Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 333-339, 1969.

Sledovali jsme patologicko-anatomicky, histologicky a kultivačně nástup tuberkulózních změn a přítomnost mykobakterií v orgánech a tkáních 12 kuřic infikovaných intravenózně suspenzí *Myc. avium*. Zjistili jsme: K zvětšení sleziny dochází již 8. den po infekci, za 35 dnů vzniká miliární tuberkulóza jater a sleziny. Histologicky lze prokázat specifickou granulační tkáň v játrech a ve slezině za 14 dnů, v plicích za 21 dnů a ve dřeni kostní za 14 až 21 den. Histologicky v řezech barvených podle Ziehl-Neelsena byly nalezeny mykobakterie v játrech a ve slezině 8. den, v plicích 21. den po infekci. Kultivace byla 8. den výrazně pozitivní z jater a sleziny, slabě pozitivní z plic, 10. den ze dřene kostní, 8. až 14. den z ledvin, 14. den ze svalů, vaječníku a z mozku. Kultivace z obsahu střevního byla negativní. Ze 12 infikovaných slepic v průběhu 35 dnů po infekci dvě uhynuly, a to 21. a 35. den.

drůbež; tuberkulóza; experimentální infekce intravenózní; patogeneze; stáří procesu

Současná epizootologická situace v tuberkulóze hospodářských zvířat v ČSSR je charakterizována především významnými úspěchy, jichž bylo dosaženo při tlumení tuberkulózy skotu. Tím je umožněno věnovat zvýšenou pozornost tomuto onemocnění i u dalších druhů zvířat, především u drůbeže. Tato nákaza vyvolává v nynější době značné škody v socialistických i soukromých chovech drůbeže, je hlavním zdrojem infekce tuberkulózou pro prasata a u skotu je nejčastější příčinou vzniku paraalergických tuberkulinových reakcí. V posledních letech je upozorňováno i na značný epidemiologický význam aviární tuberkulózy, která vyvolává u lidí obtížně léčitelnou a většinou těžce probíhající formu nemoci.

Ukazuje se dále, že aviární tuberkulózu je nutno chápat v širším měřítku jako onemocnění postihující nejen drůbež, ale i další druhy domácího a volně žijícího ptactva. Aktuálnost celého problému nás vedla k bližšímu studiu některých epizootologických, patogenetických, patologicko-anatomických a patologicko-histologických otázek tuberkulózy drůbeže a volně žijícího ptactva.

Úvodem k našim pokusům jsme považovali za vhodné vzhledem k poměrně malému množství literárních údajů ověřit některé základní patogenetické, patologicko-anatomické a patologicko-histologické otázky aviární tuberkulózy. Studium tuberkulózních změn, především patogeneze a stáří procesu, předpokládá zvolení exaktního způsobu infekce. Zvolili jsme proto intravenózní infekci, při níž přicházejí mykobakterie bezprostředně do styku s orgány a tkáněmi.

Intravenózní infekce slepic *Myc. avium* vede vždy k úhynu infikovaných ptáků. Po aplikaci jednoho mg kultury mykobakterií dochází podle Klim -

še a Pavlase (1961) k úhynu za 30 až 40 dnů, po dávce 0,1 mg za 4 až 7 měsíců. Rožňatovskaja (1966) pozorovala u slepic infikovaných 0,2 ml suspenze zředěné 1:100 uhynutí za 24 dny, Messieri a Albino (1933) při intrahepatální infekci úhyn za 27 až 29 dnů. Makroskopické změny v orgánech se objevují u infikovaných slepic za dva až šest týdnů v pořadí: játra, slezina, střeva (Klimeš, Pavlas 1961). Rožňatovskaja (1966) udává pořadí změn: játra, slezina, plíce. Mikroskopicky zjistitelná granulární tkáň se vytváří za 10 až 14 dnů po infekci (Klimeš, Pavlas 1961). Tvorbu syncytií epiteloidních buněk v této tkáni pokládá Pavlov (1961) za projev fagocytózy a ukládání hyalinu v granulomech za výsledek imunogenního procesu.

Černý (1965) srovnával patogenezu tuberkulózních procesů u králíků po intravenózní aplikaci *Myc. bovis* a *Myc. avium*. Zjistil, že makroskopické tuberkulózní změny v orgánech se vyvinuly pouze u králíků infikovaných *Myc. bovis*, a to od 10. dne v plicích, po 12. dnu i v ledvinách, přičemž slezina a játra byly silně zvětšeny. Po infekci *Myc. avium* nevznikly makroskopické tuberkulózní změny, slezina byla výrazně zvětšena od 14. dne, 16. až 18. den i játra. První mikroskopické změny po infekci *Myc. bovis* se vytvořily v plicích za 6 hodin, po infekci *Myc. avium* ve slezině za dva dny. Epiteloidní buňky se objevily v obou případech 7. až 8. den, obrovské buňky Langhansova typu 10. den a 12. den po infekci. Na základě těchto výsledků došel Černý (1965) k závěru, že po intravenózní infekci *Myc. bovis* jsou u králíků tuberkulózní změny lokalizovány převážně v plicích (dále v játrech, slezině, ledvinách), po infekci *Myc. avium* hlavně v játrech a slezině.

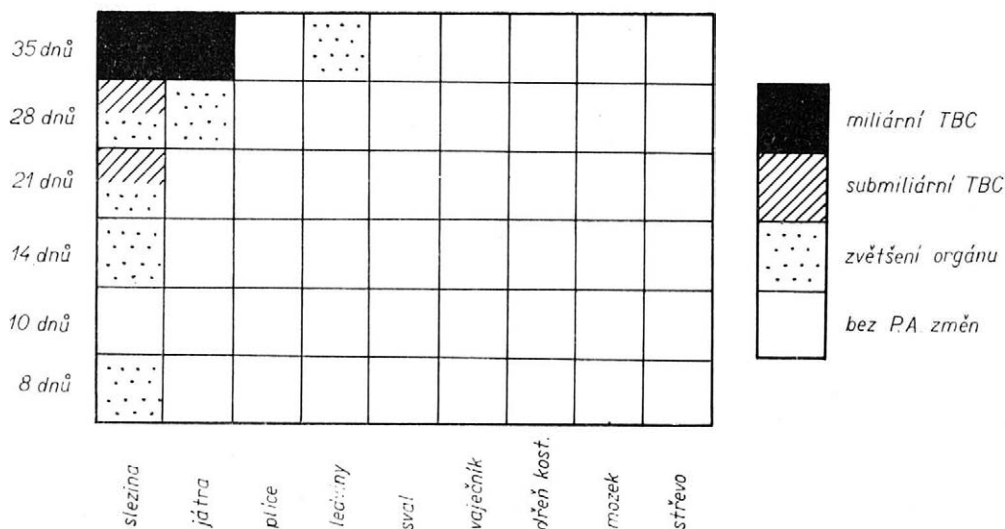
## MATERIÁL A METODY

K pokusu jsme použili dvanácti tuberkulín-negativních kuřic plemene bílá leghorna, sedm měsíců starých. Infikovány byly suspenzí zárodků *Myc. avium*, která byla připravena ze tří kmenů izolovaných z orgánů tuberkulózní drůbeže. Tyto kmeny byly plně virulentní pro drůbež. Suspenze obsahovala 0,01 mg polovlhké váhy zárodků v 1 ml. Infekční dávka byla 0,01 mg na kg živé váhy. Kuřice jsme poráželi vždy po dvou kusech 8., 10., 14., 21., 28. a 35. den po infekci, pokud dříve neuhynuly. Vyšetřovali jsme patologicko-anatomicky, histologicky a kultivací: sval, játra, slezinu, plíce, ledviny, vaječník, střevo (kultivačně obsah, histologicky *diverticulum Meckeli* a lymfatickou tkáň při vyústění slepých střev), kostní dřev, CNS (kultivačně mozek, histologicky mozek a míchu). Při patologicko-anatomickém vyšetření jsme sledovali především zvětšení a morfologické změny v parenchymatózních orgánech. Při histologickém vyšetření jsme zjišťovali jednak nástup specifické granulární tkáně, jednak přítomnost mykobakterií v histologických řezech barvených podle Ziehl-Neelsena (ZN). Kultivovali jsme na půdy podle Petraganiho a půdu sérovou ze suspenze orgánů a tkání po předchozí preparaci 10%  $H_2SO_4$  a neutralizaci 8% NaOH.

## VÝSLEDKY

Výsledky vyšetření jsou znázorněny v následujících grafech.

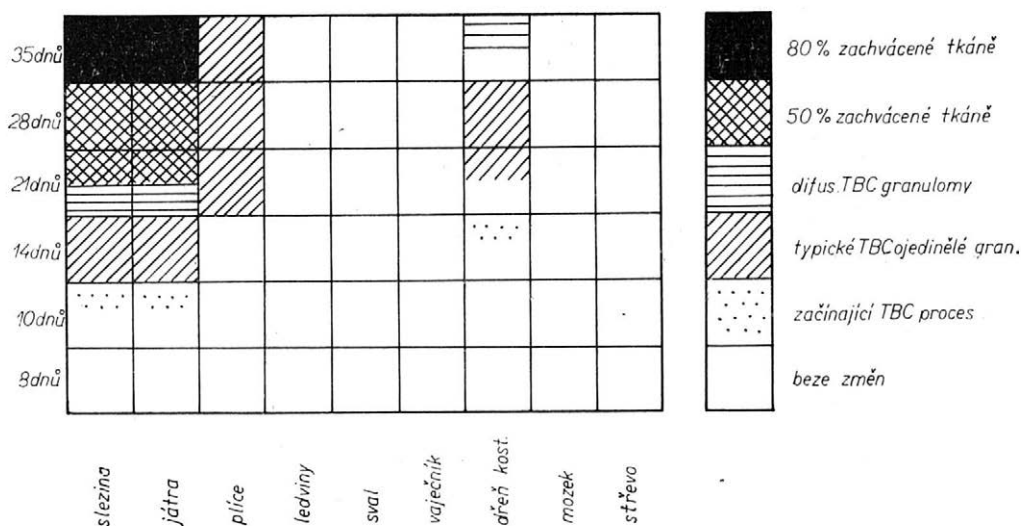
Jak je z obr. 1 patrné, měly již 8. den po infekci obě poražené slepice zvětšenou slezinu a za 28 dnů byla zvětšena i játra. Za 21 a 28 dnů byly vždy u jedné ze slepic patrné submiliární tuberkly ve slezině. Do 35 dnů se u obou



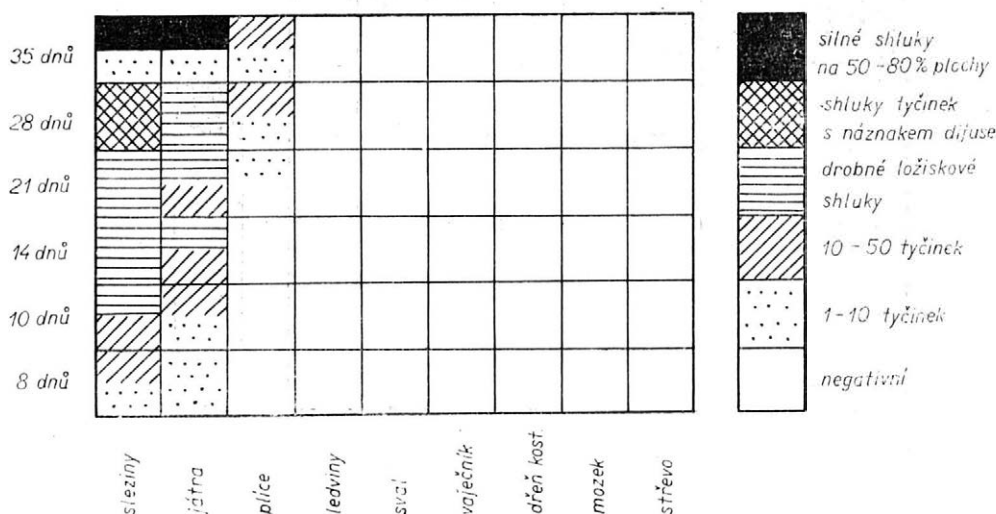
## 1. Dynamika vývoje makroskopických tbc změn

slepice vyvinula rozsáhlá miliární tuberkulóza jater a sleziny spolu se zvětšením ledvin.

Při histologickém vyšetření nebyly u slepic poražených 8. den po infekci patrné tuberkulózní změny. Za 10 dnů bylo možno pozorovat u jedné slepice začínající tuberkulózní proces ve slezině a v játrech. Typické tuberkulózní granulomy ve slezině a v játrech se vyvinuly za 14 dnů, v plicích, a u jedné slepice i v kostní dřeni, za 21 den. V kostní dřeni bylo možno u jedné slepice pozorovat začínající tuberkulózní proces již za 14 dnů. V dalších intervalech, v nichž byly slepice poraženy, pak změn ve slezině a v játrech přibývalo, v plicích



## 2. Dynamika vývoje histologických tbc změn (specifická granulární tkáň)

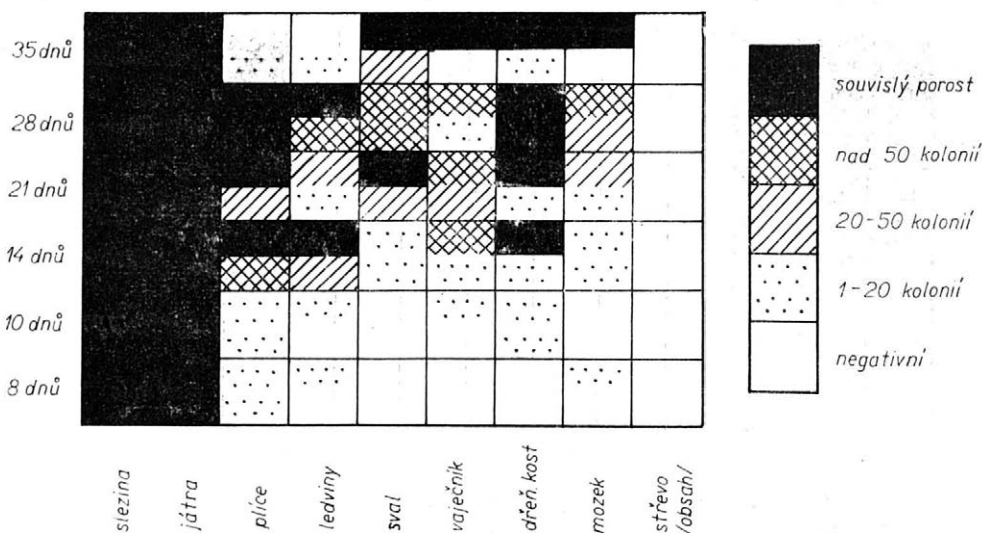


### 3. Dynamika výskytu mykobakterií v histologických řezech barvených podle ZN

a v kostní dřeni zůstávaly ve stejném množství. Ostatní orgány a tkáně byly bez histologických změn.

V řezech barvených podle ZN bylo možno ve slezině a v játrech pozorovat ojediněle mykobakterie již 8. den po infekci. Později mykobakterií v těchto orgánech přibývalo až do vzniku výrazných difúzních shluků. V plicích bylo možno nalézt mykobakterie až za 21 dnů, zatímco v histologických řezech z dalších orgánů a tkání, včetně dřene kostní, mykobakterie nalezeny nebyly.

Kultivací byly počínaje 8. dnem po infekci prokazovány ve velkém množství mykobakterie v játrech a ve slezině (růst v podobě souvislého povlaku na



### 4. Výsledky kultivačního vyšetření

Petragnaniho půdě). Z plic byly od 8. dne rovněž izolovány mykobakterie, avšak 8. a 10. den pouze jako ojedinělé kolonie a teprve počínaje 14. dnem v podobě souvislého porostu. Od 14. dne byly izolovány mykobakterie ze svalů, intenzivnější růst byl pozorován od 21. dne. V ledvinách byly prokázány mykobakterie ojediněle vždy u jedné slepice poražené 8. a 10. den po infekci. Od 14. dne byl pozorován intenzivní růst z ledvin obou slepic. Obdobně tomu bylo i při kultivaci z vaječníku. Z dřene kostní byly izolovány ojedinělé kolonie mykobakterií za 10 dnů, za 14 dnů a později byl již růst intenzivní. Při kultivaci z mozku jsme již pozorovali ojedinělé kolonie u jedné slepice poražené 8. den, avšak růst u obou slepic byl zaznamenán až za 14 dní a intenzivnější růst za 21, resp. 28 dnů. V obsahu střevním se u žádné z vyšetřovaných slepic nepodařilo mykobakterie prokázat.

Z 12 infikovaných slepic dvě uhynuly během pokusu, a to 21. a 35. den. U obou byla příčinou uhynutí tuberkulóza.

## DISKUSE

Z dosažených výsledků je patrné, že u slepic infikovaných intravenózně suspenzí *Myc. avium* byly pozorovány jak patologicko-anatomické, tak histologické změny a nález mykobakterií nejdříve ve slezině a v játrech. Již 8. den po infekci byla u poražených slepic zvětšená slezina, v histologických řezech barvených podle ZN bylo možno zjistit mykobakterie a při kultivaci jsme pozorovali souvislý porost svědčící pro přítomnost velkého množství mykobakterií v inokulu. Za 14 dnů bylo možno ve slezině a v játrech pozorovat histologicky specifickou granulační tkáň a do 35 dnů makroskopické tuberkulózní změny. V dalších orgánech se během 35 dnů makroskopické změny nevyvinuly, pouze v plicích a v kostní dřeni bylo možno za 21 dnů, resp. za 14 a 21 dnů, pozorovat vznik specifické granulační tkáně a v plicích přítomnost mykobakterií v řezech barvených podle ZN. Tato lokalizace změn je přibližně stejná, jak ji pozoroval Černý (1965) u králíků infikovaných *Myc. avium*. Zdá se podle toho, že existuje výrazná afinita aviárních mykobakterií především ke slezině a játrům.

Podle našich zjištění se během 35 dnů vyvinula specifická granulační tkáň pouze ve slezině, játrech, plicích a kostní dřeni. Mykobakterie však byly přítomny i v dalších orgánech a tkáních. Při kultivaci byly mykobakterie izolovány kromě obsahu střevního ze všech dalších vyšetřovaných vzorků. Odlišná však byla doba po infekci, kdy byla kultivace z jednotlivých vzorků pozitivní, a intenzita růstu. Podle výsledků kultivace byly mykobakterie přítomny v ledvinách 14., resp. částečně již 8. a 10. den, ve svalů, vaječníku a v mozku 14. den po infekci. Lze předpokládat, že v těchto orgánech a tkáních by mohly později vzniknout rovněž tuberkulózní změny. Je však zajímavé, že nebyla postižena stěna střevní (negativní histologické vyšetření) a ani v obsahu střevním nebyly mykobakterie přítomny. Výsledky kultivačního vyšetření tedy potvrzují, že při intravenózní infekci drůbeže *Myc. avium* jsou v první řadě postižována játra, slezina a dále pak plíce a dřeň kostní. Stěna střevní, kde bývají velmi často při spontánní tuberkulóze lokalizovány tuberkulózní změny, vyžaduje zřejmě ke vzniku tuberkulózních procesů přímý kontakt s infekčním agens, tj. perorální infekci, nebo další časový odstup při intravenózní infekci, aby došlo k vylučování mykobakterií žlučí při tuberkulóze jater.

## Literatura

- ČERNÝ L., 1965, Příspěvek k patogeneze tuberkulózy a některé histochemické studie tuberkulózní granulační tkáně. Habilitační práce, Brno.
- KLIMES B., PAVLAS M., 1961, Příspěvek k experimentální infekci slepic tuberkulózou. Sborník VŠZ, Řada B, Spisy fakulty veterinární, 9 (30) : 49-62.
- MESSIERI ALBINO, 1933, La tubercolosi sperimentale dei polli trasmessa per via intraepatica. Jb. Vet. Med., 53 : 90-91.
- PAVLOV R. G., 1961, O gistomorfologii i gistogeneze tuberkulezných izmenij u kuric. Naučni trudove, Sofia, 9 : 71-84.
- ROŽNJATOVSKAJA O. I., 1966, K izučeníju patogeneza tuberkuloza u kur. Veterinarija, Kijev, 9 : 177-181.

Došlo dne 18. 12. 1968

ГЕЙЛИЧЕК К., УЛЬРИХОВА Й., ЗЕНДУЛКА М. (Сельскохозяйственный институт, факультет ветеринарии, Брно, Чехословакия). Интравенозная инфекция кур *Mycobacterium avium* Vet. Мед. (Прага) 14 (6) : 333-339, 1969.

Изучалось наступление патологоанатомических, гистологических и культивационных tubеркулезных изменений и наличие микобактерий в органах и тканях 12 кур, интравенозно зараженных суспензией *Myc. avium*. Было установлено, что увеличение селезенки наступает уже на восьмой день после инфекции. Через 35 дней возникает милиарный tubеркулез печени и селезенки. Гистологически можно установить специфическую грануляционную ткань в печени и в селезенке через 14 дней, в легких — через 21 день, а в костном мозгу спустя 14—21 день. Гистологически в срезах, окрашенных по Циль-Нельсону, были найдены микобактерии в печени и в селезенке на восьмой день, а в легких — на 21 день после инфекции. Культивация была на восьмой день отчетливо положительная из печени и селезенки, слабо положительная — из легких, на десятый день — из костного мозга, на 8—14 день — из почек, на 14 день — из мышц, яичника и мозга. Культивация из содержания кишечника была отрицательная. Из 12 зараженных кур в течение 35 дней погибли две, а именно на 21 и 35 день.

домашняя птица; tubеркулез; экспериментальное интравенозное заражение; патогенез; возраст процесса

HEJLIČEK K., ULLRICHOVÁ J., ZENDULKA M. (University of Agriculture, Veterinary Faculty, Brno, Czechoslovakia). *Intravenous Infection of Mycobacterium Avium in Hens*. Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 333-339, 1969.

The paper gives a description of a pathological-anatomical, histological, and cultivation examination of the occurrence of tuberculous changes and of the presence of mycobacteria in the tissues and organs of 12 pullets intravenously infected with a suspension of *Mycobacterium avium*. The following changes were observed: an enlargement of spleen, occurring already on the eighth day from the infection, and miliary tuberculosis occurring in liver and spleen in 35 days; a specific granulation tissue which can be histologically proved in liver in 14 days, in spleen in 14 days, in lungs in 21 days, and in bone marrow in 14—21 days. In slices coloured according to Ziehl-Neelsen, mycobacteria were histologically found in liver and spleen on the eighth day, and in liver on the 21<sup>st</sup> day from the infection. On the eighth day, the cultivation was remarkably positive for liver and spleen, and slightly positive for lungs; on the tenth day there was a positive cultivation for bone marrow; on the 8<sup>th</sup>—14<sup>th</sup> day for kidneys, and on the 14<sup>th</sup> day for muscle, ovaria and brain. The cultivation of the content of intestines was negative. Of the 12 hens infected, two died (on the 21<sup>st</sup> and 35<sup>th</sup> day) during the 35 days following the infection.

poultry; tuberculosis; experimental intravenous infection; pathogenesis; age of the process

HEJLIČEK K., ULLRICHOVÁ J., ZENDULKA M. (Landwirtschaftliche Hochschule, Fakultät für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Intravenöse Infektion der Hennen durch Mycobacterium avium*. Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 333-339, 1969.

Man beobachtete pathologisch-anatomisch, histologisch und kultivationsmäßig den Antritt tuberkulöser Veränderungen und die Anwesenheit von Mykobakterien in den

Organen und Geweben von 12 Junghennen, die mit einer Suspension von *Mycobacterium avium* intravenös infiziert worden waren. Es konnte festgestellt werden, daß eine Vergrößerung der Milz bereits am achten Tag nach der Infektion eintritt; nach 35 Tagen entsteht Miliartuberkulose der Leber und Milz. Das spezifische Granulationsgewebe in der Leber und Milz kann man nach 14 Tagen, in der Lunge nach 21 Tagen und im Knochenmark nach 14—21 Tagen histologisch nachweisen. In den 21 Tagen und im Knochenmark nach 14-21 Tagen histologisch nachweisen. In den nach Leber und Milz am achten Tag, in der Lunge am 21. Tag nach der Infektion. Die Kultivation war am achten Tag aus der Leber und Milz ausgeprägt positiv, aus der Lunge schwach positiv, desgleichen am zehnten Tag aus dem Knochenmark, am 8.—14. Tag aus der Niere, am 14. Tag aus dem Muskel, aus den Eierstöcken und dem Hirn. Die Kultivation aus dem Darminhalt war negativ. Von 12 infizierten Hennen gingen binnen 35 Tagen nach der Infektion zwei ein, u. zw. am 21. und 35 Tag.

Geflügel; Tuberkulose; experimentelle intravenöse Infektion; Pathogenese; Alter des Prozesses

---

*Adresa autorů:*

MVDr. Karel Hejliček, CSc., VŠZ, veterinární fakulta, katedra epizootologie, Brno, Palackého 1-3

Vedoucí: Prof. MVDr. Jaroslav Dražan, CSc.

MVDr. Jana Ullrichová, asistent, prof. MVDr. Miloslav Zendulka, VŠZ, veterinární fakulta, katedra patologické anatomie, Brno, Palackého 1-3

Vedoucí: Prof. MVDr. Miloslav Zendulka

---

Při uplatňování nových poznatků výzkumu v zemědělské praxi  
Vám účinně pomohou

## **METODIKY**

pro zavádění výsledků výzkumu do praxe

Přinášejí nové, stručné a srozumitelné návody a jsou určeny  
především vedoucím pracovníkům zemědělských podniků, agro-  
nomům, zootechnikům a mechanizátorům

V roce 1969 vyjde 35 různých titulů **METODIK**. Zajistěte si je  
včasnou objednávkou za celoroční předplatné Kčs 100.—

S novinkami vědecko-výzkumného pokroku Vás seznámí

## **Zemědělské aktuality ze světa**

Na 90 stránkách jsou v krátkých a výstižných člancích otiskovány  
novinky ze všech oborů zemědělství a referáty o výsledcích zahra-  
ničního výzkumu. Časopis **Zemědělské aktuality ze světa** čerpá  
z bohatých zdrojů vědecké, odborné a technické literatury a ča-  
sopisů, z literatury firemní a patentové

Vychází pravidelně měsíčně a roční předplatné činí Kčs 72.—

**Objednávky adresujte**

ČSAZ - ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ,  
Slezská 7, Praha 2 — Vinohrady

# VÝBĚR VIROVÉHO KMENE PRO PŘÍPRAVU INAKTIVOVANÉ VAKCÍNY PROTI PSEUDOMORU DRŮBEŽE

K. Černík, V. Rajtár

Bioveta, Nitra

ČERNÍK K., RAJTÁR V. Výběr virového kmene pro přípravu inaktivované vakcíny proti pseudomoru drůbeže. Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 341-350, 1969.

Pokusně byly ověřovány vakcíny, připravené z pěti kmenů viru pseudomoru drůbeže. Čtyři kmeny, lentogenní La Sota, mezogenní Hertfordshire a Roakin a velogenní 366/4, byly pomnoženy v kuřecích zárodcích a tkáňová linie kmene Roakin, R/TK<sub>50</sub>, na jednovrstevných kulturách kuřecích embryonálních buněk. Virus byl inaktivován beta-propiolaktonem v koncentraci 0,05 % dvě hodiny při 37 °C a adsorbován na gel hydroxidu hlinitého v konečné koncentraci 10 %. Celkem bylo očkováno 771 kuřat ve věku od čtyř týdnů do tří měsíců intramuskulárně dávkou 1,0 ml vakcíny. 160 kuřat bylo revakcinováno stejnou dávkou čtyři týdny po první vakcinaci. Imunitní odpověď po vakcinaci byla sledována sérologicky a vyvolávající infekcí. Po první dávce vakcíny u kuřat plně vnímavých byl vzestup hemaglutinačně inhibičních a neutralizačních protilátek zanedbatelný, do titru 1 : 20. Po revakcinaci a vakcinaci kuřat, která vykazovala určitou hladinu protilátek, došlo k výraznému zvýšení titru až na 1 : 160-320. Odolnost vůči čelenži kolísala od 40 do 100 % po první vakcinaci, po revakcinaci byla 100%. Nejlépe se osvědčily vakcíny z kmene Hertfordshire a La Sota, i když rozdíl proti ostatním kmenům nebyly vždy významné a konstantní. Po vakcinaci nebyly pozorovány poruchy zdravotního stavu ani pokles váhových přírůstků kuřat.

lentogenní, mezogenní a velogenní kmeny; kultury kuřecích embryonálních buněk; beta-propiolakton; gel hydroxidu hlinitého; hemaglutinačně inhibiční a neutralizační protilátky

Potřeba nové, účinné inaktivované vakcíny se dostává v poslední době do popředí zájmu přes všechny její nevýhody, z nichž nejvýznamnější jsou vyšší náklady nejen na samotnou očkovací látku, ale i na její aplikaci.

Výběr a inaktivace vhodného virového kmene značně ovlivňuje antigenitu inaktivovaných virových vakcín. Při hledání inaktivčního prostředku, který by zajišťoval vysoký stupeň antigenity a zároveň nepoškozoval plasmatické bílkoviny, se podle zpráv mnoha autorů i podle vlastních zkušeností (Černík, Žuffová 1967) osvědčil jako vysoce účinný beta-propiolakton (BPL). Podle Hofstada a kol. (1963) vakcína inaktivovaná BPL vyvolala pevnější imunitu než vakcíny inaktivované formalinem a zářením gama. Podle pokusů Škody a Žuffy (1957) s vakcínou z kmene Lederle, inaktivovanou formalinem, nedošlo do čtyř týdnů k signifikantnímu zvýšení titru protilátek a vyvolávající infekci přežilo jen 50 % kuřat.

Předmětem pokusů, popsaných v tomto sdělení, bylo porovnat imunizační účinnost adsorbátových vakcín proti pseudomoru drůbeže, připravených z pěti kmenů viru pseudomoru drůbeže (Newcastleské nemoci, N. n.), inaktivovaných BPL.

## MATERIÁL A METODY

Vakcíny: K přípravě vakcín jsme použili pěti kmenů viru N. n.: lentogenní La Sota, mezogenní Hertfordshire, Roakin a jeho tkáňová linie R/TK<sub>50</sub> a velogenní 366/4. Virové kmeny s výjimkou linie R/TK<sub>50</sub> byly pomnoženy na

kuřecích zárodků (k. z.) inokulací desetidenních k. z. intraalantoicky dávkou u mezogenních a velogenního kmene ca  $2 \times 10^3$  a u kmene La Sota ca  $2 \times 10^5$  EID<sub>50</sub>. Vajíčka, očkováná lentogenním kmenem, byla inkubována 72 hod., ostatní 48 hod. Kuřecí embrya, která uhynula do 24 hod., jsme vyřadili. Po ochlazení vajec byla sterilně odebrána alantoamniotická tekutina (AAT). Linie R/TK<sub>50</sub> byla pomnožena na jednovrstevných kulturách kuřecích embryonálních buněk (KEB) v Rouxových lahvích o obsahu 1200 ml, naočkováných dávkou ca  $1 \times 10^5$  TKID<sub>50</sub> a inkubovaných 48 hod. při 37 ° C. Virus, vázaný na buňky, byl uvolněn zmrazením a rozmrazením.

Získanou infekční suspenzi, obsahující virus vaječného i tkáňového původu, jsme centrifugovali 30 min. při 2000 obr./min. Supernatant byl inaktivován beta-propiolaktonem v koncentraci 0,05 % po dobu dvou hodin ve vodní lázni 37 ° C teplé, jak bylo popsáno v předcházejícím sdělení (Černík, Žuffová 1967). Před inaktivací a po ní jsme odebrali vzorky virové suspenze a titrovali je na zkumavkových kulturách KEB. Účinnost inaktivace viru jsme ověřili naočkováním dvanácti desetidenních k. z. neředěnou inaktivovanou suspenzí. Hynutí k. z. jsme sledovali 7 dní, pak jsme odebrali AAT z ochlazených vajec a vyšetřili hemaglutinačním testem (HA) podobně jako AAT, odebranou z uhynulých vajec. Inaktivaci jsme považovali za spolehlivou, pokud uhynuly jen jednotlivé k. z. do 24 hod. po inokulaci a HA titr nedosahoval 1 : 4, u tkáňových kultur pokud infekční titr, zjištěný podle cytopatogenního účinku a hemaglutinační reakce, nepřesahoval  $10^{1.5}$  TKID<sub>50</sub>/0,1 ml. pH tkáňové suspenze, které pokleslo následkem hydrolýzy beta-propiolaktону, bylo upraveno 1 n roztokem NaOH na ca 6,5. Inaktivovaná virová suspenze byla adsorbována na gel hydroxidu hlinitého (Al(OH)<sub>3</sub> gel), který byl přidán do koncentrace 10 % celkového objemu. Hotovou adsorbátovou vakcínu jsme konzervovali přidávkou mertiolátu v koncentraci  $10^{-4}$ .

**Pokusná kuřata:** Pokusně jsme očkovali v laboratorních podmínkách 771 kuřat ve věku od čtyř týdnů do tří měsíců, neočkovaných dosud jinou vakcínou. V prvním a v druhém pokusu, ve kterém jsme použili kuřat ve věku 10 týdnů a 3 měsíců, byl zjištěn i u neočkovaných kontrolních kusů významný stupeň přirozeně získané imunity. Kuřata byla očkována dávkou 1 ml inaktivované adsorbátové vakcíny intramuskulárně do prsních svalů. Skupiny očkových kuřat jsme chovali odděleně, ale v kontaktu mezi sebou a skupinou kontrolních neočkovaných kuřat.

**Hodnocení výsledků vakcinace:** Zdravotní stav kuřat po očkování jsme sledovali po celé období pokusu. Tři až šest týdnů po vakcinaci jsme od pokusných očkových i kontrolních kuřat odebrali vzorky krevního séra a po inaktivaci 60 minut při 56 ° C jsme je vyšetřili hemaglutinačně inhibičním (HIT) a sérumneutralizačním testem (SNT) ve zkumavkových kulturách KEB proti kmenu Roakin. V obou případech bylo použito metody sériového ředění séra s konstantním ředěním viru na obsah 4 HA jednotek, resp. 100 až 1000 TKID<sub>50</sub>. Výsledky SNT byly vyhodnoceny kumulativním výpočtem podle vzorce Reeda a Muenche (1938) jako padesátiprocentní neutralizační dávka (ND<sub>50</sub>).

Zároveň byla všechna kuřata podrobena vyvolávající infekci podkožní aplikací terénního kmene 366/4 v dávce  $2 \times 10^5$ – $10^6$  infekčních dávek (EID<sub>50</sub>) na kus a úhyn byl sledován 14 dní po infekci.

V pátém pokusu jsme část kuřat revakcinovali tři týdny po první vakcinaci

a HI a neutralizační titr jsme zjišťovali u všech kuřat tři týdny po vakcinaci a sedm týdnů po vakcinaci, resp. čtyři týdny po revakcinaci, kdy byla všechna kuřata podrobena vyvolávající infekci.

## VÝSLEDKY

V prvním a v druhém pokusu (tab. I a II) byla očkována kuřata, která se do doby pokusné vakcinace částečně imunizovala přímým nebo nepřímým kontaktem s kuřaty, očkovanými živou vakcínou, takže i kontroly vykazovaly sérologicky určitý stupeň imunity a uhynulo z nich po vyvolávající infekci jen 60, resp. 25 %. Titry hemaglutinačně inhibičních i neutralizačních protilátek v séru stouply po vakcinaci velmi výrazně (tab. II). Výsledky čelenže nelze spolehlivě hodnotit s ohledem na malý počet uhynulých kontrol. Rozdíly mezi použitými kmeny byly bezvýznamné.

Ve třetím pokusu (tab. III) byla očkována vnímavá kuřata ve věku čtyř týdnů. Kontrolní neočkovaná kuřata uhynula všechna po čelenži, avšak i z očkovaných uhynulo v jednotlivých skupinách vysoké procento, a to zvláště po aplikaci vakcín z mezogenních a velogenního kmene, jejichž infekční titry před

I. Účinek vyvolávající infekce pět týdnů po očkování desetitýdenních kuřat inaktivovanou absorbátovou vakcínou z kmene 366/4 viru pseudomoru drůbeže

| Virový kmen | TKID <sub>50</sub> před inaktivací | Počet kuřat | Věk kuřat | Vyvolávající infekce po pěti týdnech |         |
|-------------|------------------------------------|-------------|-----------|--------------------------------------|---------|
|             |                                    |             |           | infik./uhyn.                         | % uhyn. |
| 366/4       | 8,67                               | 14          | 10 t.     | 14/2                                 | 14,3    |
| Kontroly    | —                                  | 5           | 10 t.     | 5/3                                  | 60      |

II. Hladina protilátek v séru a účinek vyvolávající infekce tři týdny po očkování tříměsíčních kuřat inaktivovanými adsorbátovými vakcínami z pěti různých kmenů viru pseudomoru drůbeže

| Virový kmen        | TKID <sub>50</sub> před inaktivací | Počet kuřat | Věk kuřat | Protilátky v séru po třech týdnech |                    | Vyvolávající infekce po třech týdnech |         |
|--------------------|------------------------------------|-------------|-----------|------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|---------|
|                    |                                    |             |           | Ø HIT                              | Ø ND <sub>50</sub> | infik./uhyn.                          | % uhyn. |
| 366/4              | 8,67                               | 18          | 3         | 160                                | 100                | 16/0                                  | 0       |
| Roakin             | 9,5                                | 18          | měsíce    | 320                                | 275                | 17/0                                  | 0       |
| R/TK <sub>50</sub> | 7,67                               | 18          |           | 160                                | 200                | 13/0                                  | 0       |
| La Sota            | 6,23                               | 18          |           | 160                                | 160                | 18/1                                  | 5,5     |
| Hertfordshire      | 8,0                                | 18          |           | 160                                | 90                 | 13/1                                  | 7,7     |
| Kontroly           | —                                  | 10          |           | 20                                 | 13                 | 8/2                                   | 25      |

Ø HIT = průměrný hemaglutinačně inhibiční titr

Ø ND<sub>50</sub> = průměrná padesátiprocentní neutralizační dávka

III. Hladina protilátek v séru a účinek vyvolávající infekce čtyři týdny po očkování čtyřtýdenních kuřat inaktivovanými adsorbátovými vakcínami z pěti kmenů viru pseudomoru drůbeže

| Virový kmen        | TKID <sub>50</sub> před inaktivací | Počet kuřat | Věk kuřat | Protilátky v séru po čtyřech týdnech |                    | Vyvolávající infekce po čtyřech týdnech |         |
|--------------------|------------------------------------|-------------|-----------|--------------------------------------|--------------------|-----------------------------------------|---------|
|                    |                                    |             |           | Ø HIT                                | Ø ND <sub>50</sub> | infik./uhyn.                            | % uhyn. |
| 366/4              | 7,5                                | 18          | 4 týdny   | <5                                   | <5                 | 14/5                                    | 35,6    |
| Roakin             | 5,33                               | 18          |           | 10                                   | 12,5               | 17/4                                    | 23,5    |
| R/TK <sub>50</sub> | 7,33                               | 18          |           | 10                                   | 7,0                | 16/6                                    | 37,5    |
| La Sota            | 6,67                               | 18          |           | 20                                   | 23,4               | 17/3                                    | 17,6    |
| Hertfordshire      | 5,5                                | 18          |           | <5                                   | <5                 | 15/9                                    | 60,0    |
| Kontroly           | —                                  | 10          |           | <5                                   | <5                 | 8/8                                     | 100,0   |

IV. Hladina protilátek v séru a účinek vyvolávající infekce šest týdnů po očkování čtyřtýdenních kuřat inaktivovanou adsorbátovou vakcínou z kmene R/TK<sub>50</sub> viru pseudomoru drůbeže

| Virový kmen        | TKID <sub>50</sub> před inaktivací | Počet kuřat | Věk kuřat | Protilátky v séru po šesti týdnech |                    | Vyvolávající infekce po šesti týdnech |         |
|--------------------|------------------------------------|-------------|-----------|------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|---------|
|                    |                                    |             |           | Ø HIT                              | Ø ND <sub>50</sub> | infik./uhyn.                          | Ø uhyn. |
| R/TK <sub>50</sub> | 8,0                                | 300         | 4 týdny   | 10                                 | 10                 | 19/3                                  | 16,0    |
| Kontroly           | —                                  | 10          | 4 týdny   | <5                                 | <5                 | 10/10                                 | 100,0   |

inaktivací byly relativně nízké. Sérologicky byl zjištěn vzestup HI a neutralizačních protilátek zvláště po aplikaci vakcíny z kmene La Sota.

Uspokojivých výsledků jsme dosáhli ve čtvrtém pokusu (tab. IV), při němž byl tkáňovou vakcínou z linie R/TK<sub>50</sub> naočkován velký soubor 300 kusů čtyřtýdenních vnímavých kuřat. Titry protilátek v séru byly sice poměrně nízké — v průměru 1 : 10, ale po vyvolávající infekci šest týdnů po vakcinaci uhynulo jen 16 % očkovaných.

V pátém pokusu (tab. V) došlo po vakcinaci do tří týdnů k významnému vzestupu HI i neutralizačních protilátek, které však poklesly během dalšího období čtyř týdnů. Avšak při použití kmenů 366/4 a La Sota ještě po sedmi týdnech byla imunita dostatečně pevná a 90 % kuřat odolávalo vyvolávající infekci. Po jednorázové aplikaci vakcíny z kmene Roakin a R/TK<sub>50</sub> podlehl vyvolávající infekci po sedmi týdnech 50, resp. 60 % kuřat.

Po revakcinaci vakcínami z kmene 366/4, R/TK<sub>50</sub>, resp. Hertfordshire se zjišťoval velmi výrazný vzestup sérových protilátek, zvláště u kmene Hertfordshire, kde dosahoval HIT v průměru 1 : 112 a ND<sub>50</sub> v průměru 1 : 160. Tkáňovou vakcínou z linie R/TK<sub>50</sub>, která vyvolala poměrně nízké titry, se dosahovaly při revakcinaci po předcházejícím použití vaječné vakcíny vysoké titry sérových protilátek. Z použitých produkčních kmenů se nejlépe osvědčily podle výsledků séro-

V. Hladina protilátek v séru tři týdny po očkování pětitédenních kuřat inaktivovanými adsorbátovými vakcínami z pěti kmenů viru pseudomoru drůbeže a další vzestup protilátek a účinek vyvolávající infekce čtyři týdny po revakcinaci

| Virový kmen        | TKID <sub>50</sub> před inaktivací | Skupina | Počet kuřat | Věk kuřat | Protilátky v séru tři týdny po vakcinaci |                    | Revakcinace tři týdny po vakcinaci | Protilátky v séru 1 měsíc po revakcinaci |                    | Vyvolávající infekce sedm týdnů po vakcinaci, čtyři týdny po revakcinaci |         |
|--------------------|------------------------------------|---------|-------------|-----------|------------------------------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------|
|                    |                                    |         |             |           | HIT                                      | Ø ND <sub>50</sub> |                                    | HIT                                      | Ø ND <sub>50</sub> | inf./uhyn.                                                               | % uhyn. |
| 366/4              | 8,67                               | 1       | 33          | 5 týdnů   | 14                                       | 5,0                | —                                  | 4                                        | 2,0                | 10/1                                                                     | 10      |
| Roakin             | 8,23                               | 2       | 29          |           | 13                                       | 4,0                | 366/4                              | 28                                       | 27,5               | 10/0                                                                     | 0       |
|                    |                                    | 3       | 32          |           | 10                                       | 4,0                | —                                  | 4                                        | 3,0                | 10/5                                                                     | 50      |
|                    |                                    | 4       | 35          |           | 14                                       | 6,5                | R/TK <sub>50</sub>                 | 80                                       | 96,0               | 10/0                                                                     | 0       |
| R/TK <sub>50</sub> | 7,77                               | 5       | 18          |           | 10                                       | 4,0                | —                                  | 4                                        | 2,0                | 10/6                                                                     | 60      |
| La Sota            | 6,77                               | 6       | 34          | 5 týdnů   | 5                                        | 4,0                | R/TK <sub>50</sub>                 | 14                                       | 13,5               | 10/0                                                                     | 0       |
|                    |                                    | 7       | 28          |           | 10                                       | 6,5                | —                                  | 8                                        | 4,0                | 10/1                                                                     | 10      |
| Herts.             | 8,5                                | 8       | 33          |           | 13                                       | 8,0                | R/TK <sub>50</sub>                 | 80                                       | 100,0              | 10/0                                                                     | 0       |
|                    |                                    | 9       | 35          |           | 14                                       | 4,0                | Herts.                             | 112                                      | 160,0              | 10/0                                                                     | 0       |
| Kontroly           |                                    | 10      | 25          |           | <2                                       | <2                 | —                                  | <2                                       | <2                 | 10/10                                                                    | 100     |

logického vyšetření a vyvolávající infekce vaječné vakcíny z kmene Hertfordshire a La Sota. Vyvolávající infekci čtyři týdny po revakcinaci odolala všechna kuřata. V žádném případě jsme nepozorovali po vakcinaci poruchy zdravotního stavu ani pokles váhových přírůstků u kuřat v pokusu čtvrtém a pátém, která byla z tohoto hlediska sledována v souvislosti s pokusným ověřováním krmných směsí.

## DISKUSE

Názory na kritéria pro výběr kmenů k přípravě inaktivované vakcíny nejsou jednotné a také výsledky, dosažené jednotlivými autory s kmeny různých vlastností, nebyly vždy shodné. Účinnost používaných pokusných i komerčních vakcín značně kolísá pod vlivem různých faktorů. Hofstad (1967) vyhodnocoval imunogenní účinnost šesti komerčních inaktivovaných vakcín proti N. n. Kuřata byla očkována ve věku šesti týdnů a čelenžována po dalších šesti týdnech. Dosažená rezistence se pohybovala mezi 9 a 99 % (v průměru tří pokusů od 27 do 84 %).

Lepších výsledků se podařilo dosáhnout při použití kmenů s vyšší virulencí. Sullivan a kol. (1958) porovnávali vakcíny z kmenů GB-Texas, Roakin-NJ a Manhattan-Kan, inaktivované BPL. Po jednotlivé dávce vakcíny byla odolnost vůči čelenži 65 až 100 % a kolísala podle použitého vakcinačního kmene a podle intervalu mezi vakcinací a vyvolávající infekcí. Nejlépe se osvědčil kmen GB-Texas. Pini a kol. (1965) porovnávali účinnost inaktivova-

ných vakcín z lentogenního kmene F a velogenního Kabete s mezinárodní standardní vakcínou při očkování čtyř až pětítýdenních kuřat. Dva týdny po vakcinaci byly výsledky sérologického vyšetření i vyvolávající infekce o něco lepší po vakcíně z kmene Kabete. Při porovnávání doby trvání imunity však nebyly patrné rozdíly. Dobrých výsledků dosáhli *Grun a Hudson* (1966) s BPL inaktivovanou kombinovanou vakcínou ze čtyř kmenů viru N. n.: GB (George Boney), La Sota, Indian Partridge a Horowitz. Zjistili, že inaktivovaná vakcína vyvolává stejně pevnou a trvalou odolnost jako živé vakcíny. V dalších pokusech dokázal *Grun* (1966), že vakcíny vyrobené z kmenů s vyšší neurotropní aktivitou jsou účinnější. Lentogenní kmen La Sota nebyl dostatečně antigenní, aby mohl být použit jako jediná virová složka inaktivované vakcíny, ačkoliv se v našich pokusech osvědčil velmi dobře a byl podle účinnosti zařazen na přední místo. O velmi příznivých výsledcích při pokusném použití vakcíny z lentogenního kmene F, inaktivovaného BPL, referovali *Piercy a kol.* (1962, 1964). Vysoký stupeň imunity byl průkazný po dobu jednoho roku. Podobně *Hanson a kol.* (1951), kteří porovnávali imunogenitu pěti kmenů různé virulence pro kuřata a s různým stupněm termostability ve formě inaktivované adsorbátové vakcíny, zjistili při očkování čtyřtýdenních kuřat, že virulence ani termostabilita produkčních kmenů nemá přímý vztah k antigenitě vakcíny. Rozdíl v imunogenitě dvou linií kmene GB-Texas, lišících se termorezistencí hemaglutininů, nepozorovali *Hofstad a kol.* (1963).

*Piercy a kol.* (1965) zjistili, že účinnost vakcinace dvou a třítýdenních kuřat byla téměř stejná, ale při rozdělení kuřat do skupin podle váhy a celkové kondice byly zjištěny zřetelně lepší výsledky u méně vyvinuté skupiny, ačkoliv rozdíl nebyl statisticky významný. Toto zjištění se nám nepodařilo potvrdit. V našem pátém pokusu byly očkovány skupiny kuřat, které byly současně a nezávisle na očkování podrobeny krmenému pokusu. V době očkování byla skupina 6., 8. a 9. (tab. V) ve velmi dobrém výživném stavu, skupina 4. v dobrém stavu a naopak 1. a 5. ve velmi špatném stavu. Výsledky sérologického vyšetření případně vyvolávající infekce nenasvědčují však vlivu výživného stavu a celkové kondice na odpověď po vakcinaci.

Věk pokusných kuřat v době vakcinace byl omezen z obou stran. U kuřat do třetího týdne věku může být vakcinace do značné míry nepříznivě ovlivněna přítomností mateřských protilátek (*Keeble a kol.* 1963a, *Christie a kol.* 1963, *Box a kol.* 1963, *Box* 1965). *Kudrjavcev a kol.* (1966) zjistili, že protilátky kuřat z vajec dva měsíce po vakcinaci nosnic mizí do 25. dne věku, ale odolnost vůči vyvolávající infekci se ztrácí už do 15. dne věku. Naproti tomu *Otta* (1959) pozoroval při kontrole inaktivované vakcíny „Dessau“, že věk kuřat v době vakcinace má jen malý význam pro vznik imunity. Dokonce ani u osmidenních kuřat nebyl imunogenní proces horší než u starších.

Pro nás bylo velmi obtížné získat pro pokusné očkování kuřata starší než dva měsíce, která by dosud nepřišla do styku s virem N. n. a nebyla přirozeně imunizována. Nejvhodnější doba prvního vakcinačního zákroku byla tedy limitována na dobu mezi třemi a šesti týdny věku. K podobným závěrům dospěli i *Hofstad a kol.* 1963, *Hofstad* 1967) a očkovali kuřata ve věku čtyř až osmi týdnů, resp. 6 týdnů. Také *Garside* (1962) podobně jako *Cooper* (1963) doporučují všeobecně první vakcinaci ve věku tří týdnů. *Grillo a kol.* (1964) pozorovali nejlepší imunitní odpověď na inaktivovanou vakcínu u kuřat ve věku 150 dní.

Z našich pokusů jasně vyplývá nutnost revakcinace inaktivovanou vak-

cínou tři až čtyři týdny po první vakcinaci, kdy dochází k charakteristické anamnestické odpovědi, měřitelné sérologicky i vyvolávající infekcí (tab. V). Ani v tomto ohledu však není naprostá shoda mezi jednotlivými autory. Keeble a kol. (1963b) doporučují revakcinovat po 14 dnech, zvláště tehdy, byla-li kuřata poprvé očkována ve stáří tří týdnů. S čtrnáctidenním intervalem mezi první a druhou dávkou vakcíny učinil špatné zkušenosti Hofstad (1953), kterému se osvědčily dvě dávky, podané v intervalu tří měsíců, jež vyvolaly vysoký stupeň imunity, trvající nejméně osm měsíců po revakcinaci. Delší interval — 8 až 12 týdnů — mezi první a druhou dávkou vakcíny doporučují Keeble (1963), Cooper (1963), Piercy a kol. (1964) i Gill a Stone (1964), ovšem za předpokladu, že imunitní odpověď na první vakcinaci byla dostatečná.

Hodnocení stavu imunity podle hladiny HI a neutralizačních protilátek není spolehlivé (Heinig, Schmidt 1954, Schmidt, Schmidt 1955). Také Otta (1959) potvrdil, že není možno podle výsledků HIT usuzovat na imunitní stav očkovaných. Signifikantní vzestup titru HI protilátek u většiny imunních kuřat může však být dostatečným důkazem imunitního stavu. To podporuje i nález Garsidea (1962), že jednotlivé kusy v hejnu nereagují stejně na vakcinaci, jsou více nebo méně odolné vůči infekci a dvě až tři procenta kuřat nereagují vůbec. Také naše pokusy dokazují, že sérologické vyšetření může být sice pozitivním kvantitativním ukazatelem stavu imunity v hejnu, není však rozhodující jako záporný ukazatel.

Úloha adjuvancií, dávkování vakcíny a trvání imunity bude předmětem dalšího sdělení.

## Literatura

- BOX P. G., KEEBLE S. A., CHRISTIE D. W., 1963, Vaccination against Newcastle disease. *Vet. Rec.*, 75, 49 : 1342-1344.
- BOX P. G., 1965, The influence of maternal antibody on vaccination against Newcastle disease. *Vet. Rec.*, 77, 9 : 246-250.
- BOX P. G., HEMSLEY L. A., 1965, Vaccination against Newcastle disease: Effect of double vaccination of broiler chicks. *Vet. Rec.*, 77, 19 : 549-551.
- COID C. R., KEEBLE S. A., 1962, Duration of immunity against Newcastle disease in chicks vaccinated with BPL inactivated vaccine. *Vet. Rec.*, 74, 41 : 1112.
- COOPER D. M., 1963, The effect on egg production of vaccinating chickens against Newcastle disease with beta-propiolactone inactivated vaccine. *Vet. Rec.*, 75, 3 : 75.
- CERNÍK K., ŽUFFOVÁ J., 1967, Příprava inaktivované vakcíny proti pseudomoru drůbeže. I. Inaktivační účinek beta-propiolaktону a formalinu na virus pseudomoru drůbeže. *Vet. Med. (Praha)*, 12, 5 : 255-262.
- GARSIDE J. S., 1962, Newcastle disease vaccination. *Vet. Rec.*, 74, 51 : 1497-1499.
- GILL E., STONE H. D., 1964, Newcastle disease: Immune response in chickens to BPL-killed virus vaccine. *Avian Dis.*, 8, 1 : 61-71.
- GRILLO TORRADO J. M., SMITSAART T. E., POLERO de MUSLERA B. J. a j., 1964, Haemagglutination-inhibiting antibody response to inactivated Newcastle disease vaccines. *Revta. Investes Agropec.*, Ser. 4, 1, 13 : 157-169.
- GRUN J., 1966, Antigenicity of beta-propiolactone inactivated NDV vaccines prepared from various strains. *Poultry Sci.*, 45, 3 : 492.
- GRUN J., HUDSON C. B., 1966, Comparison of a BPL whole embryo Newcastle disease vaccine (one strain) with a BPL amnioallantoic Newcastle disease vaccine (four strains). *Poultry Sci.*, 45, 1 : 159-164.
- HANSON R. P., CROOK E., BRANDLY C. A., 1951, Comparisons of immunogenicity of five strains of Newcastle disease virus as formalinized vaccines. *Vet. Med.*, 46 : 451-452.

- HEINIG A., SCHMIDT U., 1954, Untersuchungen über das Hertfordshire-Virus. Arch. exp. Vet. Med., 8: 517-540.
- HOFSTAD M. S., 1953, A method of evaluating immunity following vaccination of chickens with inactivated Newcastle disease vaccine. Am. J. vet. Res., 14: 590-593.
- HOFSTAD M. S., PICKEN J. C., COLLINS K. E. aj., 1963, Immunogenicity of inactivated Newcastle disease virus preparations. Avian Dis., 7, 4: 435-445.
- HOFSTAD M. S., 1967, An evaluation of commercial inactivated Newcastle disease vaccines. Avian Dis., 11, 2: 198-202.
- CHRISTIE D. W., KEEBLE S. A., BOX P. G., 1963, Vaccination against Newcastle disease. Vet. Rec., 75, 18: 484-485.
- KEEBLE J. A., 1963, Vaccination against Newcastle disease with an inactivated vaccine. Veterinarian (Oxford), 1, 1: 29-36.
- KEEBLE S. A., BOX P. G., CHRISTIE D. W., 1963a, Vaccination against Newcastle disease. Vet. Rec., 75, 6: 151-152.
- KEEBLE S. A., WADE J. A., 1963 b, Inactivated Newcastle disease vaccine. J. comp. Path., 73, 2: 186-200.
- KUDRJAVEC F. C., ČISTOVA Z. J., SJURIN V. N., 1966, Vlijanije metoda vakcinacii na naprižennost immuniteta u cypljat k psevdočume. Veterinarija, 42, 1: 39-41.
- OTTA J., 1959, Immunisierungsversuche bei Küken mit Geflügelpestschutzimpfstoff „Dessau“, Mh. Vet.-med., 14, 12: 373-376.
- PIERCY S. E., MACLEOD A. J., BLAXLAND J. D., 1962, Potency of an inactivated Newcastle disease vaccine prepared from an avirulent strain of virus. — Vet. Rec., 74, 50: 1478-1479.
- PIERCY S. E., MACLEOD A. J., BLAXLAND J. D., 1964, Duration of immunity trials with betapropiolactone-inactivated Newcastle disease virus vaccine. Vet. Rec., 76, 39: 1084-1089.
- PIERCY S. E., MACLEOD A. J., BLAXLAND J. D., 1965, The influence of some variable factors on the potency testing of inactivated Newcastle disease vaccines. Progr. Immunobiol. Stand., 2: 259-266.
- PINI A., DANSKIN D., COACKLEY W., 1965, Comparative evaluation of the potency of beta-propiolactone inactivated Newcastle disease vaccines prepared from a lentogenic strain and a velogenic strain. Vet. Rec., 77, 5: 127-129.
- REED L., MUENCH H., 1938, A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg., 27: 493-497.
- SCHMIDT U., SCHMIDT D., 1955, Über die Beziehungen der hämagglutinationshemmenden Antikörper zur Immunität nach Vakzinierung gegen Geflügelpest. Arch. exp. Vet. Med., 9: 505-516.
- SULLIVAN J. F., GILL E., SOMER A. M., 1958, Immune response of chickens to beta-propiolactone killed Newcastle disease vaccine. Am. J. vet. Res., 19: 483-488.
- ŠKODA R., ŽUFFA A., 1957, Imunizačná účinnosť inaktivovaných vakcín proti Newcastle'skej chorobe pripravených s lipoidnými adjuvanciami a s hydroxydom aluminia. Vet. čas., 6, 2: 117-123.

Došlo dne 14. 10. 1968

ЧЕРНИК К., РАЙТАР В. (Биовета, Нитра, Чехословакия) Отбор вакцинального штамма вируса для изготовления инактивированной вакцины против псевдоочумы птиц. Vet. Med. (Прага) 14. (6): 341-350, 1969.

Экспериментальным способом проверяли вакцины, изготовленные из пяти штаммов вируса псевдоочумы птиц. Четыре штамма — лентогенный La Sota, мезогенные Hertfordshire и Roakin и велогенный 366/4, культивировали в зародышах цыплят и тканевую линию штамма Roakin, R/TK50, на однослойных культурах куринного эмбриона клеток. Вирус инактивировали при помощи бета-пропиолактона в течение 2 часов при температуре 37 °C в концентрации 0,05 % и адсорбировали на гель гидроокиси алюминия в оксидальной концентрации 10 %. Всего вакцинировали 771 цыпленка в возрасте 4 недель — 3 месяцев внутримышечной дозой 1,0 мл вакцины. 160 цыплят повторно вакцинировали той же дозой спустя 4 недели после первой вакцинации. Иммунную реакцию после вакцинации исследовали серологически и проверяли при помощи вызывающей инфекции. После первой дозы вакцины у вполне восприимчивых цыплят оказался подъем тормозящих гамма-глютинацию и нейтрализующих антител незначительным — до титра 1:20. После ревакцинации и вакцинации цыплят, которые показывали определенное количество антител, на-

блюдалось отчетливое повышение титра вплоть до 1:160—320. Невосприимчивость против членика колебалась от 40—100 % после первой вакцинации после второй вакцинации она оказалась 100 %. Лучше всего оправдали себя вакцины штаммов Hertfordshire и La Sota, хотя различия по сравнению с остальными штаммами были не всегда значительными и постоянными. После вакцинации не установили ни расстройства состояния здоровья, ни понижения привеса цыплят.

лентогенные, мезогенные и велогенные штаммы; культуры куриных эмбриональных клеток; бета-пропиолактон; гель гидрооксида алюминия; антитела, задерживающие гемагглютинацию и нейтрализующие антитела

ČERNÍK K., RAJTÁR V. (Bioveta, Nitra, Czechoslovakia) *Selection of a Virus Strain for the Preparation of an Inactivated Vaccine against Newcastle Disease*. Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 341-350, 1969.

Tests were carried out to examine vaccines prepared from five strains of *Newcastle Disease virus*. Four strains — lentogenic La Sota, mesogenic Hertfordshire and Roakin and velogenic 366/4 — were propagated in chick embryos, and the tissue line of the strain Roakin — R/TK<sub>50</sub> — in monolayer cultures of chick embryonal cells. The virus was inactivated by  $\beta$ -propiolactone in the concentration of 0.05 % for 2 hours at 37 °C and adsorbed on aluminium hydroxide gel in the final concentration of 10 %. The vaccine was applied intramuscularly to 771 chicken aged from 4 weeks to 3 months. The dose was 1.0 ml. 4 weeks after the first vaccination, 160 chicken were revaccinated with the same dose. The immunity response to vaccination was examined serologically and with challenge infection. After the first dose of the vaccine applied to fully sensitive chicken the increase of hemagglutination inhibition and neutralization antibodies was negligible — up to the titre of 1:20. Revaccination and the vaccination of chicken showing some level of antibodies resulted in a marked increase in the titre up to 1:160—320. Resistance to challenge varied between 40 and 100 % after the first vaccination; after revaccination it was 100 per cent. Best results were obtained from the vaccines of the strains Hertfordshire and La Sota, though the differences from others were not always significant and constant. No disturbances in the health state and no decrease in the weight gains were observed to be caused by the vaccination.

lentogenic, mesogenic and velogenic strains; chick embryonal cell cultures;  $\beta$ -propiolactone; aluminium hydroxide gel; hemagglutination inhibition and neutralization antibodies

CERNÍK K., RAJTÁR V. (Bioveta, Nitra, Tschechoslowakei) *Auswahl des Virusstammes für die Herstellung einer inaktivierten Vakzine gegen die atypische Geflügelpest*. Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 341-350, 1969.

In Versuchen wurden die aus fünf Stämmen des atypischen Geflügelpest Virus hergestellten Vakzine überprüft. Vier Stämme, und zwar der lentogene La-Sota-Stamm, der mesogene Hertfordshire- und Roakin-Stamm und der velogene 366/4-Stamm wurden in Kükenembryonen und die Gewebelinie des Roakin-Stammes, R/TK<sub>50</sub>, wurde in Einschichtkulturen von Kükenembryozellen vermehrt. Das Virus wurde mit Beta-Propiolaktone in einer Konzentration von 0,05 % 2 Stunden hindurch bei 37 °C inaktiviert und auf Aluminiumhydroxydgel bei einer Endkonzentration von 10 % adsorbiert. Insgesamt wurden 771 Küken im Alter von 4 Wochen bis 3 Monate intramuskulär mit der Dosis 1,0 ml geimpft. 160 Küken wurden mit der gleichen Dosis in 4 Wochen nach der ersten Vakzination revakzinieren. Die Immunreaktion nach der Vakzinierung wurde serologisch und durch eine auslösende Infektion getestet. Nach der ersten Vakzinedosis war bei den voll empfänglichen Küken der Anstieg der Hämagglutinations-, Inhibitions- und Neutralisations-Antikörper bis zum Titer von 1:20 bedeutungslos. Nach Revakzinierung und Vakzinierung der Küken, welche ein bestimmtes Antikörperriveau aufweisen, kam es zu einer ausgeprägten Erhöhung des Titers bis auf 1:160—320. Die Resistenz gegen das Challenge schwankte von 40 bis 100 % nach der ersten Vakzinierung und sie war eine hundertprozentige nach der Revakzinierung. Am besten bewährten sich aus den Stämmen Hertfordshire und La Sota hergestellten Vakzinen, wenn auch die Unterschiede im Vergleich mit den anderen Stämmen nicht immer signifikant und konstant waren. Nach der Impfung

wurden keine Störungen des Gesundheitszustandes und keine Verminderung der Gewichtszunahmen der Kücken beobachtet.

Lentogene, mesogene und velogene Stämme; Kückenembryozellen-Kulturen; Beta-Propiolakton; Aluminiumhydroxydgel; Hämagglutinations-, Inhibitions- und Neutralisations-Antikörper

---

*Adresy autorů:*

MVDr. Karel Černík, odd. vývoje a výzkumu, BIOVETA, Nitra

Vedoucí odd.: Doc. MVDr. A. Žuffa, CSc.

MVDr. Vojtech Rajtár, CSc., ÚŠKVBL, Nitra

---

# DIAGNOSTIKA VIROVÉ GASTROENTERITIDY PRASAT Z HISTOLOGICKÝCH ŘEZŮ POMOCÍ IMUNOFLUORESCENČNÍ METODY

Z. Pospíšil, E. Mesároš, J. Štěpánek

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

---

POSPÍŠIL Z., MESÁROŠ E., ŠTĚPÁNEK J. *Diagnostika virové gastroenteritidy prasat z histologických řezů pomocí přímé imunofluorescenční metody.* Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 351-356, 1969.

Byla propracována přímá imunofluorescenční metoda vhodná pro diagnózu virové gastroenteritidy prasat ze střevních řezů. Pomocí této metody byla u přirozeně a experimentálně infikovaných selat pozorována specifická, jasně žlutozelená fluorescence cytoplasmy infikovaných enterocytů v jejunu a ileu, zatímco neinfikované enterocyty vykazovaly jen slabě zelenou nespecifickou fluorescenci. U experimentálně infikovaných selat byly první enterocyty s fluorescencí cytoplasmy pozorovány za 18 hodin po infekci a přibývalo jich až do 72 nebo 96 hodin od počátku infekce. Po této době nastal výrazný pokles jejich počtu. U přirozeně onemocnělých selat byl největší počet enterocytů s fluorescencí cytoplasmy pozorován ve stáří 3 až 5 dnů, u starších jejich množství rychle klesalo.

virová gastroenteritida; selata; imunofluorescence; enterocyty; cytoplasma; diagnostika

---

Diagnóza virové gastroenteritidy prasat (VGP) se doposud opírá vedle zhodnocení klinických příznaků a epizootologické situace především o pozitivní výsledek biologického pokusu, což je postup značně zdoluhavý.

V poslední době se k rychlému stanovení diagnózy některých infekčních onemocnění používá metody imunofluorescenčního průkazu antigenu. U virové gastroenteritidy prasat však tato metoda nebyla ještě dostatečně propracována a pro diagnostiku využita.

Pokud je možno z literatury zjistit, bylo imunofluorescenční metody častěji použito pro studium viru infekční gastroenteritidy prasat na tkáňových kulturách — Mc Clurkin (1965), Mc Clurkin a kol. (1966), Konishi a kol. (1967), Norman a kol. (1968), než pro vlastní diagnostiku. Ukázalo se, že virový antigen infekční gastroenteritidy prasat je možno imunofluorescenčně na tkáňových kulturách velmi dobře prokázat v cytoplasmě infikovaných buněk, kde vzniká výrazná žlutozelená fluorescence.

Jen Konishi a kol. (1967) prokazovali pomocí přímé imunofluorescenční metody antigen VGP v otiskových preparátech, připravených z tenkých střev, mezenterálních mizních uzlin a tonzil experimentálně infikovaných selat. Cytoplasma infikovaných buněk vykazovala difúzní granulární žlutozelenou fluorescenci. Zmínku o imunofluorescenčním průkazu původce virové gastroenteritidy prasat v epiteliálních buňkách střevních klků nacházíme také v práci Haeltermana a kol. (1967).

Z těchto nepříliš početných údajů je zřejmé, že imunofluorescenční metoda nebyla doposud pro běžné diagnostické účely u virové gastroenteritidy prasat zavedena. Vzhledem k tomu, že rychlá diagnostika je pro jakákoliv účinná opatření proti této nákaze nezbytná, pokusili jsme se propracovat imunofluorescenční techniku u virové gastroenteritidy tak, aby byla vhodná pro nejširší použití v diagnostické praxi.

## MATERIÁL A METODIKA

**Selata přirozeně infikovaná:** Bylo vyšetřeno 68 přirozeně infikovaných selat pocházejících z lokalit „M“ a „K“, kde VGP měla typický průběh a byla potvrzena biologickým pokusem. Sedm selat pocházelo z lokality „J“, kde se nákaza vyskytovala sporadicky, měla atypický průběh a vyšetřovaná selata onemocněla teprve ve stáří 7 dnů. Kontrolní selata pocházela z chovu prostého gastroenteritidy prasat.

**Selata experimentálně infikovaná:** 14 dvoudenních selat pocházejících z chovu prostého VGP jsem infikovali *per os* 5 ml 10% abakteriální střevní suspenze (připravené homogenizací tenkých střev a mízních uzlin nemocných selat pocházejících z lokalit „M“ a „K“). Suspenze byla filtrována na Seitzově EK V filtru a nepřítomnost bakterií byla prokázána na krevním a Czapek—Doxově agaru. Selata byla usmrcována za 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 a 96 hodin po infekci.

**Specifické antisérum proti viru VGP** bylo získáno z prasnice, která pocházela z chovu prostého virové gastroenteritidy. Prasnice onemocněla poprvé spolu se svými selaty, infikovanými experimentálně typovým kmenem viru VGP — Purdue. Za 30 dní po uzdravení byla prasnice infikována perorálně 250 ml 10% střevní suspenze ze střev nemocných selat. O 10 dnů později byla prasnice stejným způsobem reinfikována a za dalších 10 dnů vykřena. V séru byly prokázány protilátky ve zředění 1:512/100 TCID<sub>50</sub>.

Sérum pro přípravu negativního konjugátu bylo získáno z chovu prostého VGP i jiných průjemových onemocnění. SN-testem v něm nebyly prokázány protilátky proti VGP.

**Konjugát** byl připraven podle modifikace Albrechta (1963) — vysolování globulinové frakce síranem amonným, konjugace s FITC. Volný FITC byl odstraněn na Sephadexu G 25. Před prvním použitím byl konjugát vysycen jaterním práškem.

**Zpracování materiálu:** Bezprostředně po usmrcení selat byly odebrány 5 mm dlouhé vzorky z různých úseků střev a 22 mm silné vzorky z mezenteriálních mízních uzlin a tonsil, které byly přes noc fixovány ve vychlazeném acetonu při teplotě +4 °C. Potom byly vzorky zkrácenou metodou prosyceny parafinem (projasnění benzenem 2 × 20 minut při pokojové teplotě, prosycení v nízkotajícím parafinu 2 × 25 minut při teplotě 56 °C) a zality do dalšího parafinu. Bločky byly uchovávány v lednici. Řezy 4 až 5 μ silné byly na sklíčka lepeny bez glycerin—bítku a po zaschnutí za 2 až 3 hod. barveny.

**Imunofluorescenční „barvení“:** Po zkráceném odparafinování (xylen 2 × 2 minuty, alkohol 96% 2 minuty, 70% 1 minutu) byly řezy přeneseny na několik minut do pufovaného fyziologického roztoku o pH 7,1 (8,5 g NaCl; 1,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> bezvodý; 0,4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O do 1 litru destilované vody). Potom byly řezy ve vlhké komůrce převrstveny konjugátem po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Dalších 30 minut byly řezy propírány v pufovaném fyziologickém roztoku 4krát vyměněným, aby se vypral nenavázaný konjugát. Řezy byly montovány do pufovaného glycerinu pH 7,1 a prohlíženy fluorescenčním mikroskopem ML 2.

**Kontroly:** 1. stejné řezy byly převrstveny negativním konjugátem, 2. stejné řezy byly převrstveny nejdříve pozitivním imunním sérem nekonjugovaným, po vykoupání teprve pozitivním konjugátem, 3. řezy zdravého selete byly převrstveny pozitivním konjugátem.

## VÝSLEDKY

**Přirozená infekce.** V tenkých střevních selat nemocných virovou gastroenteritidou prasat byla pomocí přímé imunofluorescenční metody zjištěna výrazná fluorescence infikovaných enterocytů střevní výstelky (obr. 1). V cytoplasmě těchto buněk byla pozorována specifická, jasně zelenožlutá fluorescence, většinou zářící difúzně, někdy také ve formě granulí. Jádra enterocytů fluorescenci nevykazovala.

Vedle pozitivních buněk střevní výstelky byly nacházeny i neinfikované enterocyty, které vydávaly jen slabě nazelenalou nespecifickou fluorescenci. Stejný druh nespecifické fluorescence bylo možno pozorovat i v buňkách stromatu klků a v *lamina propria mucosae*. V těchto místech však byla ojediněle patrna výraznější nespecifická fluorescence, kterou vydávaly eosinofilní granulocyty. Velmi výrazná nespecifická fluorescence byla pozorována u uhynulých selat, u nichž sliznice podléhá velmi rychle autolytickým a hnilobným procesům.

Nejmasivnější specifická fluorescence enterocytů byla pozorována u selat 3 až 5 dnů starých, u nichž byly současně nejvíce rozvinuty klinické příznaky choroby. Pozitivní enterocyty byly u těchto případů rozsety téměř po celém povrchu klků v jejunu a ileu a lemovaly tak celé lumen střeva. U starších selat — 6 až 7denních došlo k rychlému poklesu počtu fluoreskujících buněk a u 10denních selat nebyly v žádné části střeva fluoreskující buňky pozorovány.

Od těchto časových údajů se lišilo vyšetření 6 selat 9 až 10 dnů starých, která pocházela z lokality s netypickým, vleklým průběhem nákazy, kde selata onemocněla obvykle až v 7. dnu života. Jejich vyšetřením byl v jejunu a ileu zjištěn poměrně značný počet enterocytů, které vykazovaly pozitivní fluorescenci (obr. 2). U tří až čtyřdenních selat z této lokality nebyly však v žádném případě pozitivní buňky pozorovány.

V mezenterálních mízních uzlinách a tonzilách nemocných selat byl pozorován podobný obraz nespecifické fluorescence tkáně i granulocytů, avšak pozitivně fluoreskující buňky nebyly zjištěny.

**Experimentální infekce:** První pozitivně fluoreskující enterocyty byly pozorovány za 18 hodin po infekci buď jednotlivě nebo ve skupinách, a to hlavně na bázi klků v jejunu a ileu (obr. 3). Enterocyty vykazovaly specifickou, jasně zelenožlutou fluorescenci cytoplasmy a negativní tmavé jádro.

V dalších časových intervalech — až do 72 hodin, popřípadě 96 hodin po infekci výrazně přibývalo pozitivních enterocytů, které postupovaly od báze k vrcholku klků a byly postupně rozsety po jejich celém povrchu. Avšak ani ve značně pozitivních řezech nevydávaly pozitivní fluorescenci všechny buňky střevní výstelky (obr. 4).

Po 96 hodinách se množství pozitivních enterocytů začalo výrazně snižovat, což bylo zvláště patrné na bázi klků.

Mezenterální mízní uzliny a tonzily vykazovaly pouze nespecifickou fluorescenci.

Vyšetřením kontrolních řezů z nemocných i zdravých selat byla pozorována jen nespecifická fluorescence celé tkáně. V některých místech byly nalezeny ojediněle nespecificky fluoreskující eozinofilní granulocyty, avšak epiteliální výstelka střeva jasnější fluorescenci nikdy nevykazovala.

## DISKUSE

Použití přímé imunofluorescenční metody při vyšetřování střev selat nemocných virovou gastroenteritidou prasat ukázalo, že této metody může být vhodně využito pro rychlou diagnostiku nákazy. V cytoplasmě infikovaných enterocytů dochází totiž ke vzniku specifické žlutozelené fluorescence, zatímco neinfikované enterocyty vydávají jen nespecifickou nazelenalou fluorescenci.

Jak vyplývá z poznatků s experimentální infekcí, je imunofluorescenční metoda pro diagnózu virové gastroenteritidy spolehlivá a použitelná zejména v období, v němž dochází k nejvýraznějšímu pomnožení viru v enterocytech, což je souběžně doprovázeno i výrazným rozvojem klinických příznaků nemoci. První buňky s pozitivní fluorescencí se objevují totiž za 18 hod. po infekci, což odpovídá nástupu klinických příznaků choroby a výrazné zvyšování počtu fluoreskujících enterocytů do 72 až 96 hodin po infekci odpovídá klinickému rozvoji nemoci. Za 4 až 5 dnů, kdy jsme pozorovali snižování počtu pozitivních enterocytů, zjišťoval Haeltzman a kol. (1967) histologicky regeneraci epitelu a do 10 dnů již zcela normální obraz.

Vezmeme-li v úvahu tyto údaje a dále skutečnost, že v přirozených podmínkách dochází k infikování selat zpravidla první den po narození, zdá se, že v lokalitách s typickým průběhem onemocnění budou pro diagnózu virové gastroenteritidy prasat pomocí imunofluorescenční metody nejvhodnější selata tři až pět dnů stará.

Poznatek, že množství pozitivních enterocytů ve střevní sliznici je závislé na délce infekce, je podpořen i vyšetřením 6 selat z lokality „J“. U těchto selat, která onemocněla prokazatelně až ve stáří 7 dnů, bylo zjištěno v 10. dnu po narození velké množství enterocytů s fluorescencí cytoplasmy, zatímco selata z lokalit „M“ a „K“, která onemocněla ihned po narození a pokud onemocnění přežila, nevykazovala ve střevním epitelu v 10 dnech již žádné fluoreskující buňky.

Snad právě vlivem různě dlouhé doby po infekci (1–7 dnů) pozorovali Konishi a kol. (1967) v otiskových preparátech ze střev pozitivní fluoreskující enterocyty jen v 73,3 % případů.

Na rozdíl od těchto autorů se nám však nepodařilo prokázat pozitivně fluoreskující buňky v tonzilách a mezenterálních mízních uzlinách nemocných selat. V řezech z těchto tkání vykazovaly jasnou fluorescenci pouze granulocyty, které podle Nairna (1964) vydávají výraznou nespecifickou fluorescenci. Tyto buňky byly také patrné ve všech druzích kontrolních preparátů.

Pozitivní výsledky, kterých jsme v této práci dosáhli, byly získány z materiálu zpracovaného ihned po usmrcení selat. Zajímalo nás, do jaké míry ovlivní diagnózu vyšetření kadaverů. Zjistili jsme, že autolytické a hnilobné procesy ve střevech silně zvyšují nespecifickou fluorescenci tkáně a ponecháme-li kadavry ve stáji, klesá rychle možnost prokázat touto metodou ve střevech virový antigen. Při uchovávání kadaverů v lednici byla za 12 hodin ještě zjištěna fluorescence enterocytů, avšak jejich počet byl značně nižší.

Pro spolehlivé stanovení diagnózy je tedy nutno vyšetřovat selata usmrcená a ihned zpracovaná. Ve střevech zalitých do parafinu a uchovávaných v lednici bylo však možno pozitivní enterocyty prokázat i po řadě měsíců.

Výsledek imunofluorescenčního vyšetření byl také značně závislý na šetrném zpracování materiálu. Jedná se hlavně o prosycování tkáně a zalévání do parafinu, při němž teplota nesmí přestoupit 54 až 56 °C.

Dodrželi-li se výše uvedené požadavky, je však možno přímé imunofluores-

cenční metody z parafinových řezů velmi úspěšně použít pro diagnostiku virové gastroenteritidy prasat. Ve srovnání s jinými diagnostickými metodami umožňuje mnohem rychlejší stanovení diagnózy do 24 hodin; oproti použití otiskových preparátů je při parafinových řezech daleko menší nebezpečí nespecifické fluorescence, a tím umožňuje i přesnější diagnózu.

Za technickou spolupráci děkujeme M. Pokorné.

## Literatura

- ALBRECHT P., Vizualizácia antigenov metódou fluorescentných protilátok. SZdN, Praha, s. 157.
- HAELTERMAN E. O., HOOPER B. E., 1967, Transmissible Gastroenteritis of Swine as a Model for the Study of Enteric Disease. *Gastroenterology*, 53 : 109-113.
- HAELTERMAN E. O., PENSART M. B., 1967, Pathogenesis of Transmissible Gastroenteritis of Swine. XIII. Congr. Mond. Vet. 2 : 569-570.
- KONISHI S., BANKOWSKI R. A., 1967, Use of Fluorescein-Labelled Antibody for Rapid Diagnosis of Transmissible Gastroenteritis in Experimentally Infected Pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 28 : 937-942.
- Mc CLURKIN A. W., 1965, Studies on Transmissible Gastroenteritis of Swine. I. Isolation and Identification of a Cytopathogenic Virus of Transmissible Gastroenteritis in Primary Swine Kidney Cell Cultures. *Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 29 : 46-53.
- Mc CLURKIN A. W., NORMAN J. O., 1966, Studies on Transmissible Gastroenteritis of Swine. II. Selected Characteristics of a Cytopathogenic Virus Common to five Isolates from Transmissible Gastroenteritis. *Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 30 : 190-198.
- NAIRN R. C., 1964, Fluorescent Protein tracing. Livingstone, Edinburgh - London.
- NORMAN J. O., Mc CLURKIN A. W., BACHRACH H. L., 1968, Infectious Nucleic Acid from a Transmissible Agent Causing Gastroenteritis in Pigs. *J. Comp. Path.*, 78 : 227-237.

Došlo dne 19. 12. 1968

---

ПОСПИШИЛ З., МЕСАРОШ Е., ШТЕПАНЕК Я. (Научно-исследовательский институт ветеринарной медицины, Брно, Чехословакия). Диагностика вирусного гастроэнтерита свиней из гистологических срезов при помощи прямого метода иммунофлуоресценции. *Вет. мед. (Прага)* 14 (6) : 351-356, 1969.

Был разработан прямой метод иммунофлуоресценции, пригодный для диагноза вирусного гастроэнтерита свиней из кишечных срезов. При помощи этого метода у поросят, зараженных естественным и экспериментальным путем, наблюдалась специфическая явно желто-зеленая флуоресценция цитоплазмы инфицированных энтероцитов в тощей и подвздошной кишках, в то время как неинфицированные энтероциты показывали лишь светло-зеленую неспецифическую флуоресценцию. У экспериментальным путем зараженных поросят первые энтероциты с флуоресценцией цитоплазмы наблюдались спустя 18 часов после инфекции, количество которых увеличивалось вплоть до 72 или 96 часов с момента инфекции, после чего резко понизилось их количество. У естественным путем зараженных поросят максимальное число энтероцитов с флуоресценцией цитоплазмы наблюдалось в 3-5-дневном возрасте, у более старых поросят оно сильно понижалось.

вирусный гастроэнтерит; поросята; иммунофлуоресценция; энтероциты; цитоплазма; диагностика

POSPÍŠIL Z., MESÁROŠ E., ŠTĚPÁNEK J. (Research Institute of Veterinary Medicine, Brno). *The Diagnostics of Virus Gastroenteritis of Pigs from Histological Cuts Using the Direct Immunofluorescent Method.* *Vet. Med. (Praha)* 14 (6) : 351-356, 1969.

A direct immunofluorescent method of the diagnostic determination of virus gastroenteritis of pigs according to the intestinal cuts has been devised. This method provided for the observation of a specific, sharply yellow-green fluorescence of the

cytoplasma of the infected enterocytes in the jejunum and ileum of the naturally and experimentally infected piglets. The uninfected enterocytes showed only a clear green, non-specific fluorescence. In the experimentally infected piglets the first enterocytes showing a fluorescent cytoplasm were observed 18 hours after the infection and their number kept increasing for 72 or 96 hours following the infection. After this time the number markedly decreased. In the naturally infected piglets the highest number of enterocytes with the fluorescence of cytoplasm was observed at the age of 3—5 days. At higher age the number of enterocytes rapidly decreased.

virus gastroenteritis; piglets; immunofluorescence; enterocytes; cytoplasm; diagnostics

POSPÍŠIL Z., MESÁROŠ E., ŠTĚPÁNEK J. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Diagnostik der Virusgastroenteritide bei Schweinen aus den histologischen Schnitten mittels der direkten Immunofluoreszenzmethode*. Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 351-356, 1969.

Es wurde die direkte Immunofluoreszenzmethode, die für die Diagnose der Virusgastroenteritis der Schweine aus den Darmschnitten geeignet ist, ausgearbeitet. Mittels dieser Methode wurde bei den natürlich und experimentell infizierten Ferkeln eine spezifische, helle gelbgrüne Fluoreszenz des Zytoplasmas der infizierten Enterozyten im Jejunum und Ileum beobachtet, während die nicht infizierten Enterozyten nur eine schwach grüne, unspezifische Fluoreszenz aufwiesen. Bei den experimentell infizierten Ferkeln wurden die ersten Enterozyten mit der Zytoplasmafluoreszenz nach 18 Stunden nach der Infektion beobachtet und sie nahmen bis zu 72 oder 96 Stunden von Beginn der Infektion zu. Nach dieser Zeit trat eine ausdrucksvolle Herabsetzung ihrer Anzahl ein. Bei den natürlich erkrankten Ferkeln wurde die größte Anzahl der Enterozyten mit Zytoplasmafluoreszenz im Alter von 3—5 Tagen beobachtet, bei den älteren senkte sich ihre Menge rasch.

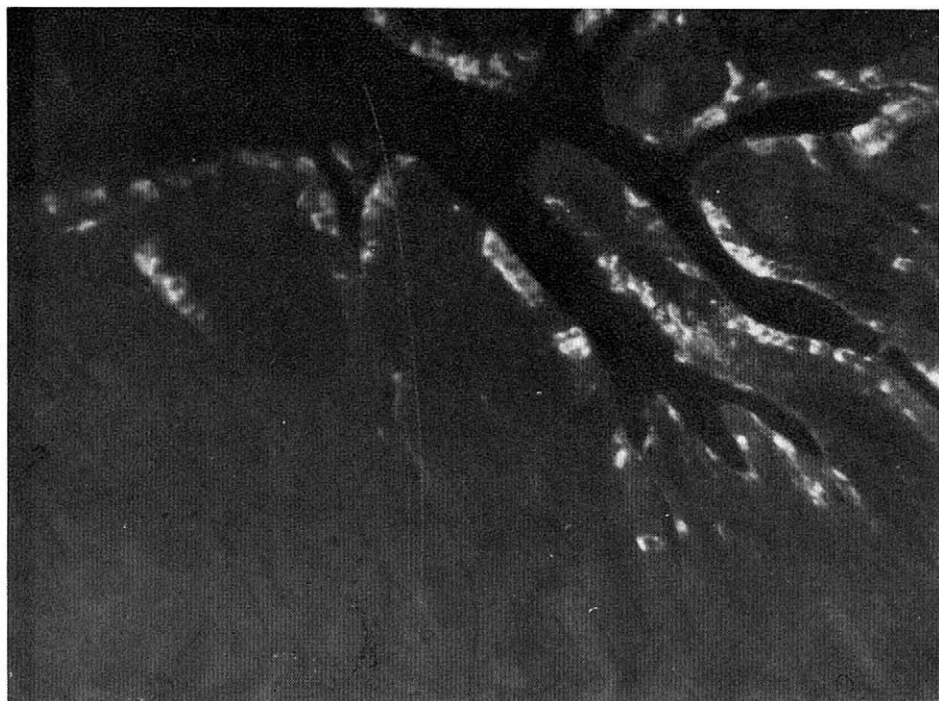
Virusgastroenteritis; Ferkel; Immunofluoreszenz; Enterozyten; Zytoplasma; Diagnostik

---

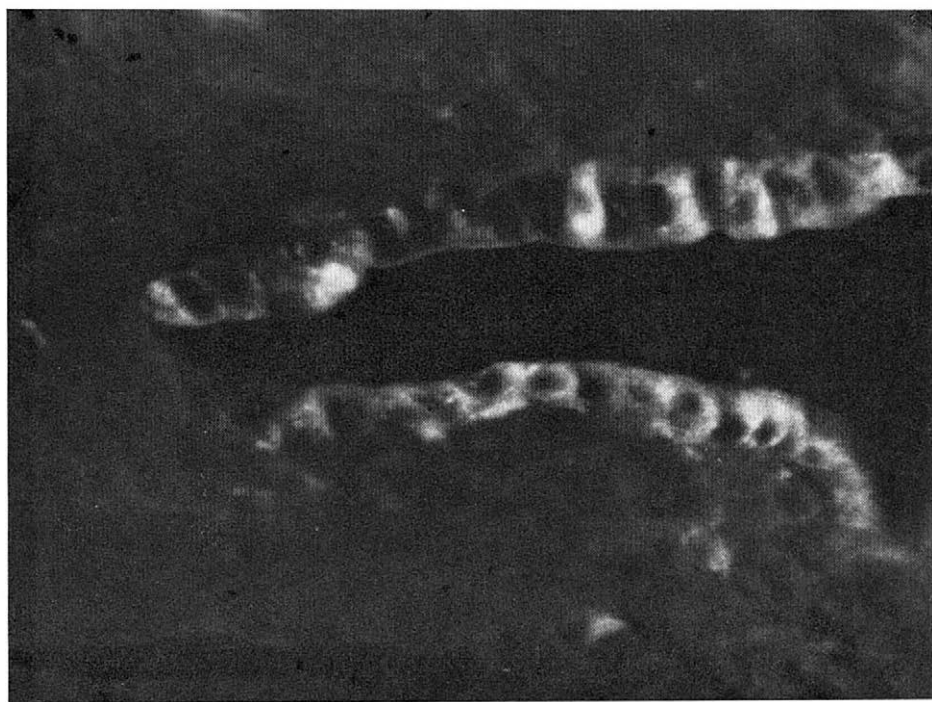
*Adresa autorů:*

MVDr. Zdeněk Pospíšil, CSc., MVDr. Ernest Mesároš, CSc., MVDr. Jan Štěpánek, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno-Medlánky  
Ředitel: Prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc.

---



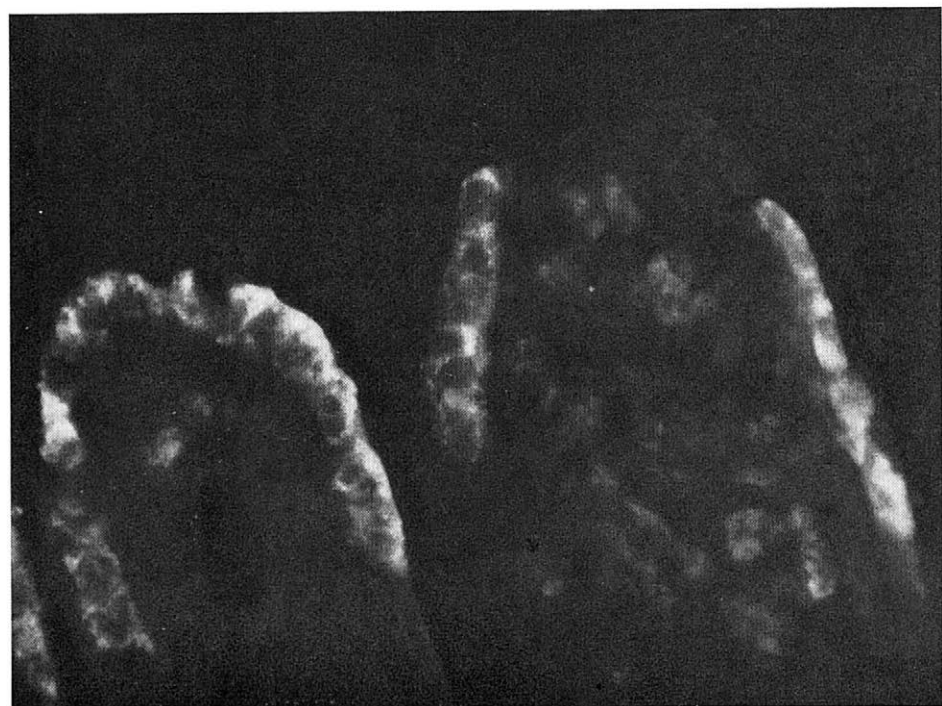
1. Výrazná pozitivní fluorescence enterocytů, slabá nespecifická fluorescence ostatní tkáně. Přirozená infekce, sele č. 67, zvětš. 10 X 3



2. Fluorescence enterocytů u selete z lokality s atypickým průběhem choroby. Sele č. 104, zvětš. 40 X 3



3. První pozitivně fluoreskující enterocyty byly pozorovány za 18 hod. po umělé infekci. Sele č. 59, zvětš. 10 X 3



4. Výrazná fluorescence enterocytů za 48 hod. po umělé infekci. Sele č. 84, zvětš. 40 X 3

# KLINICKÉ, HEMATOLOGICKÉ A BIOCHEMICKÉ ZMĚNY PŘI ADRENALEKTOMII U TELAT

M. Dvořák, M. Oplištil, J. Patka, Z. Věžník

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

DVOŘÁK M., OPLIŠTIL M., PATKA J., VĚŽNÍK Z. *Klinické, hematologické a biochemické změny při adrenalectomii u telat.* Vet. Med. (Praha) 14 (6): 357-367, 1969.

Bilaterální adrenalectomie byla provedena u 9 telat ve stáří 27 až 47 dní. Z klinických příznaků, které se začaly projevovat již třetí den, byly nejvýraznější: hypotermie, letargie, svalová adynamie, anorexie, dehydratace a bradykardie s arytmií. Byla zaznamenána eosinofilie, lymfocytóza a zvýšení hematokritové hodnoty. Byla zjištěna statisticky průkazná hyperkalémie, hypochlorémie a hyponatrémie. Poměr Na/K se prudce snížil téměř o polovinu výchozí hodnoty. Rovněž hladina krevní glukózy se rychle snižovala a případy nejvýraznější hypoglykémie byly doprovázeny konvulzemi. Koncentrace nebílkovinného dusíku v krevním séru se zvýšila až trojnásobně. Již po vynětí jedné nadledviny se zvyšoval počet eosinofilních leukocytů a začala se snižovat hladina sérových chloridů. Bilaterálně adrenalectomovaná telata žila čtyři až šest dní. Život se prodloužil a klinické příznaky se zlepšily aplikací 5 mg prednisonu, zvláště podávalo-li se současně 10 g NaCl denně, ne však samotného NaCl. Je upozorněno na podobnost symptomů i změn biochemických ukazatelů, vyvolaných experimentální adrenokortikální insuficiencí, s terminálním stadiem průjemových onemocnění telat.

adrenokortikální insuficience; hypotermie; anorexie; dehydratace; letargie; eosinofilie; lymfocytóza; hyperkalémie; hypochlorémie; hyponatrémie; snížený poměr Na/K; hypoglykémie; urémie; substituční terapie; prednison; chlorid sodný

Morfologické nálezy v nadledvinách telat uhynulých v důsledku *coli* sepse a u novorozenců bez bakteriologických nálezů (Moll 1956, Lindt 1962) daly podnět k názoru, že v patogenezi diarhey novorozenců telat hraje úlohu stav osy hypofýza — kůra nadledvin (Moll 1965). Balfour (1962) udává, že adrenální kortex dozrává u telat až v 7. až 10. týdnu po narození. Holm a kol. (1961) referovali o adrenální insuficienci u telat pocházejících od krav s prodlouženou březostí.

Důsledky nedostatečné sekrece kůry nadledvin se projevují mimo jiné v hematologických a biochemických změnách krve a mají vztah k účinkům glukokortikoidů a mineralokortikoidů. Poznatky o změnách nejdůležitějších ukazatelů minerálního metabolismu u telat s průjmy jsou poměrně bohaté (Roy a kol. 1959, Vrzgula 1964, Fisher 1965, Oplištil, Mašek 1968, Oplištil 1969 aj.), ne však vždy je možná exaktní interpretace. Proto se jevílo žádoucí vyvolat adrenální insuficienci u telat experimentálně, a to oboustrannou adrenalectomií.

Adrenalectomie u telat již byla dělána (Cupps a kol. 1960, Estergreen, Van Demark 1961, Balfour 1962, Parker 1968), většinou však za jiným účelem a nejvýše u čtyř zvířat, zpravidla starších. Telata byla substitučně ovlivňována hned po operaci. Naším cílem bylo zjistit vývoj klinických, hematologických a biochemických změn. Současně byla bilaterálně adrenalectomovaná telata používána též k ověření některých testů doporučených k diagnostice adrenokortikální insuficience se zaměřením na metabolismus glycidů. Za účelem prodloužení života byla některým z těchto experimentálních zvířat aplikována v moribundním stadiu malá množství syntetického kortikoidu prednisonu a chloridu sodného a byl zjišťován jejich terapeutický účinek.

## MATERIÁL A METODY

K adrenalektomii (adX) bylo použito celkem 10 sajících telat červenostrakatého plemene, z nichž jedno uhynulo za dva dny po pravostranné adrenalektomii a ve výsledcích není uváděno. Telata byla chována od stáří 7 až 12 dní ve stáji ústavu, napájena byla egalizovaným mlékem (s 2 % mléčného tuku) s přídavkem 10 g Galacidu Spofa dvakrát denně. Jejich další charakteristika je uvedena v tab. I.

### I. Charakteristika adrenalektomovaných telat

| Čís. | Levostranná adrenalektomie |         | Pravostranná adrenalektomie |         | Ovlivnění                                | Přežití dní     |
|------|----------------------------|---------|-----------------------------|---------|------------------------------------------|-----------------|
|      | stáří dní                  | váha kg | stáří dní                   | váha kg |                                          |                 |
| 11   | 35                         | 48      | 47                          | 57      |                                          | 5               |
| 13   | 22                         | 50      | 32                          | 55      | P 5 mg, NaCl 10g<br>3. den <sup>a)</sup> | 6 <sup>b)</sup> |
| 14   | 22                         | 50      | 32                          | 58      |                                          | 6               |
| 16   | 19                         | 36      | 29                          | 41      | P à 5 mg 3.—5. den                       | 8               |
| 17   | 17                         | 58      | 27                          | 63      |                                          | 4               |
| 19   | 22                         | 44      | 39                          | 53      |                                          | 4 <sup>b)</sup> |
| 21   | 19                         | 37      | 36                          | 46      | P 5 mg, NaCl 10g<br>5. den               | 7               |
| 22   | 18                         | 57      | 27                          | 61      | P à 5 mg, 3.—5. den                      | 9               |
| 23   | 18                         | 58      | 27                          | 63      | NaCl à 10g 3. a 4. den                   | 5               |

a) P = Prednison Spofa, den aplikace po bilaterální adrenalektomii

b) vykrveno v terminálním stádiu

Levá a pravá nadledvina byla vyňata odděleně ve dvou operacích s intervalem 9 až 17 dní. Operační technika byla v podstatě tatáž, jak ji uvádějí Estergreen a Van Demark (1961). Celkové anestéze bylo dosaženo po premedikaci Atropinem Spofa (0,1 mg/kg ž. v.) Thiopentalem Spofa (0,015 g/kg ž. v.) s následnou *i. v.* infuzí etylalkoholu ve fyziologickém roztoku (2:3). Levá adX byla dělána první, aby se zabránilo případné interferenci vyvíjejícího se bacheru.

Při pravostranné adX se osvědčilo vedení incise kůží nad posledním žebrem; po jeho vytěti pokračoval řez periostem směrem k pravé nadledvině, umístěné kraniálněji než levá. Po vynětí nadledviny při podvázání cév bez šití vény *cava* byla při pravostranné adrenalektomii vedena sutura též ve dvou vrstvách žeberním periostem. Do dutiny břišní byl aplikován roztok 0,5 g streptomycinu a lokálně při šití rány 600 tisíc j. prokainu penicilinu. Tatáž dávka penicilinu byla injikována *i. m.* v den operace a další tři dny poté. Čtvrtý den bylo aplikováno *i. m.* ještě 1,2 mil. j. Pendeponu. Těsně po ukončení druhostranné operace bylo telatům podáno *i. v.* 50 mg kortisolu ve formě Hydrocortisonu Spofa solubile.

Pokus se substituční terapií byl udělán u pěti telat, a to ve stadiu, kdy se

projevovaly výrazné klinické příznaky adrenální insuficience. Jak je uvedeno v tab. I, dvěma telatům bylo aplikováno 3., 4. a 5. den po oboustranné adX po 5 mg Prednisonu Spofa. Další dvě telata dostala jednorázově 5 mg Prednisonu Spofa s  $2 \times 5$  g chloridu sodného rozpuštěného v mléce. Jednomu teleti bylo podáváno pouze NaCl v mléce při každém napájení po dva dny, denně  $2 \times 5$  g. Prednison byl podáván vždy odpoledne před napojením.

Telata byla vyšetřována běžnými klinickými metodami. Krevní vzorky byly odebírány denně, případně opakovaně z *V. jugularis*, k hematologickému vyšetření a pro stanovení krevní glukózy z ušní vény. Pokud není uvedeno jinak, vztahují se uvedené hodnoty k odběrům, které byly dělány ráno v 7 až 8 hod. před napájením. Počet bílých krvinek (BK) byl stanoven baničkovou metodou s Türkovým roztokem počítáním v komůrce. Eosinofilní leukocyty (Eo) byly počítány ve čtyřech Bürkerových komůrkách po přenesení krve do baničky s tekutinou podle Pirališviliho (1962). Leukogram byl zhotoven z krevního nátěru obarveného podle Pappenheima vyšetřením 200 BK. Procentový objem červených krvinek krve z *V. jugularis* byl stanoven mikrohematokritem Prema. Z hodnot hematokritu byla vypočítána procentuální ztráta plasmy podle Doxiadis (Kerpel — Fronius 1959). Thornův test byl odečítán v půlhodinových intervalech do tří hodin po *i. m.* aplikaci 25 j. Corticotrophinu Spofa.

Hladiny sodíku, draslíku, vápníku, anorganického fosforu, chloridů a nebiřkovinného dusíku v krevním séru, jakož i poměry Na/K, K/Ca, Na/Cl a součiny Ca  $\times$  P anorg. byly stanoveny stejnými metodami jako v dřívějších pracích (Oplištil, Dvořák 1968). Glukóza v celé krvi byla určována glukózo-oxydázovou metodou Fermognost (VEB Arzneimittelwerk Dresden). Při statistickém zpracování dosažených výsledků byl použit F-test pro posouzení významnosti rozptylu aritmetických průměrů. K posouzení významnosti rozdílů aritmetických průměrů byl použit buď parametrický t-test (při  $F < \text{než tabelovaná hodnota}$  při  $P 0,05$ ) nebo neparametrický W-test (při  $F > \text{než tabelovaná hodnota}$  při  $P 0,05$ ).

## VÝSLEDKY

Telata se zotavovala po chirurgických zákrocích velmi dobře, bez postoperačních komplikací. I po druhostranné adX byla do 24 hod. opět čilá a s chutí přijímala dávky mléka v množství 6 až 8 l denně. Za dva dny po odstranění obou nadledvin byla telata bez klinických příznaků onemocnění, průměrná tělesná teplota byla 38,8 °C. Již třetí den se však začaly objevovat poruchy, spočívající v mírné malátnosti, slabosti končetin, vrávoravé chůzi a snížené chuti, a to u 7 zvířat z 9. U některých byla zpočátku pozorována též určitá precitlivělost na podráždění, např. při odběru krve. Ranní tělesná teplota byla snížena na 37,9 až 38,6 °C, u jednoho bylo večer naměřeno pouze 36,4 °C. U zbývajících dvou telat se uvedené symptomy projevíly čtvrtý, popř. až pátý den (č. 14).

U telat, která nebyla léčena, se vznikající poruchy rychle zhoršovaly. Tělesná teplota se během 24 hodin snižovala asi o 1 °C. V terminálním stadiu mezi 7. hod. ráno a 12. hod. v poledne klesla u jednoho z 37,2 na 35,4 °C; poté zvíře za čtvrt hodiny uhynulo. Substitučně neovlivněná zvířata žila po druhostranné adX, jak ukazuje tab. I, 4 až 6 dní. Tele č. 19, 4. den vykrvené, mělo teplotu pouze 36,4 °C.

Z klinických příznaků byly mimo hypotermii nejvýraznější: letargie až apa-

tie, anorexie, dehydratace, zpomalená činnost srdeční doprovázená arytmií, snížená náplň cév. Telata ležela vyčerpaně s hlavou položenou, často stočenou dozadu. Končetiny a uši byly studené, oči vpadlé. Jen s velkými potížemi přijala malé množství mléka, přičemž hlava musela být držena. Ojedinele byly pozorovány bolestivé konvulze (u č. 23) a někdy *sub finem* ztížený dech.

Z telat, u nichž byl učiněn pokus o substituční terapii, dostávalo tele č. 23 pouze NaCl, a to třetí a čtvrtý den. Při začátku aplikace hůře pilo, teplota klesla na  $37,9^{\circ}\text{C}$ , samo však vstávalo. Podávání NaCl nezabránilo zhoršování se klinického stavu včetně snižování tělesné teploty a tele uhynulo za 24 hodin po poslední aplikaci NaCl.

Prednison s NaCl dostalo jedno tele třetí den, kdy bylo již téměř v terminálním stadiu, s tělesnou teplotou večer  $36,4^{\circ}\text{C}$ . Byl mu aplikován též 1 ml adrenalinu. Následující den samo vstávalo, vypilo plnou dávku mléka, ranní teplota byla  $38,2^{\circ}\text{C}$ . Den poté však byl stav opět ztížený, teplota  $36,4^{\circ}\text{C}$ . Za tři dny po cvlivnění bylo *sub finem* vykřveno. Taktéž u telete č. 21 došlo k přechodnému zlepšení, uhynulo však již za dva dny po ovlivnění po prudkém snižování tělesné teploty.

Samotný prednison podávaný po tři dny v dávce po 5 mg zlepšil klinický stav, teplota se zvýšila na  $38,7$  a  $38,9^{\circ}\text{C}$ , obě telata opět sama vstávala a chodila, nevypila však již plnou dávku mléka a nezanikly příznaky dehydratace. Uhynula za dva a půl a tři a půl dne po posledním podání kortikoidu.

Hematologické změny se začaly projevovat již po vynětí první nadledviny, a to v počtu Eo. Zatímco těsně před prvostrannou adX jich bylo zjištěno  $13,9 \pm 22,8$ , před druhostrannou byl počet průkazně ( $P < 0,01$ ) zvýšený na  $207,9 \pm 72,5/\text{cmm}$ . U celkového počtu BK i jejich jednotlivých druhů došlo v této době s výjimkou bazofilních leukocytů (Ba) k mírnému snížení. Operace samy měly na krevní obraz účinek stresový, výraznější u prvostranné adX: počet BK se mírně zvýšil, Eo se snížily o více než 50 %. Naproti tomu po ukončení druhostranné operace, časově trvající stejně dlouho, asi dvě hodiny, nebylo zvýšení KB pravidelné a počet Eo se u pěti zvířat snížil jen o 14 až 42 % předoperační hladiny. Změny neutrofilních leukocytů (N) a lymfocytů (Ly) nebyly pravidelné ani při prvostranné adX.

Za dva až tři dny po bilaterální adX došlo k celkovému zvýšení počtu BK z  $9,1 \pm 1,7$  tis. až na  $14,6 \pm 2,8$  tis./cmm, způsobenému mírnou neutrofilii a výraznější lymfocytózou. Nepatrně se zvyšovaly též monocyty (Mo) a Ba, ne však u všech zvířat. Značné individuální rozdíly byly též v počtu Eo: 100–1238, třetí den  $366 \pm 411/\text{cmm}$ . Čtvrtý den se u telat substitučně neovlivněných počet BK snížil na  $10,1 \pm 1,1$  tis., Eo na  $326 \pm 182/\text{cmm}$ . Zvýraznil se rozdíl mezi procentuálním i absolutním zastoupením N a Ly. Ve srovnání se stavem před prvostrannou adX došlo u N ke snížení z 30 % na 22 %, v absolutních počtech z  $3071 \pm 1250$  na  $2320 \pm 491/\text{cmm}$ . Zvýšil se počet Ly, Mo a Ba. V žádném případě nebyly změny statisticky průkazné. Ve srovnání s krevním obrazem těsně před druhostrannou adX byly posuny u jednotlivých druhů BK obdobné, zvýšení Ly z  $5851 \pm 1145$  na  $6747 \pm 913/\text{cmm}$  však opět nebylo průkazné, podobně jako zvýšení Mo ze  $480 \pm 166$  na  $680 \pm 218/\text{cmm}$ .

Pravidelně docházelo po bilaterální adX ke zvýšení hematokritové hodnoty. I zde se však projevil výrazné individuální odchylky. Těsně před druhou operací bylo zjištěno  $26,5 \pm 7,6$  volumových procent erytrocytů. Přesto, že chirurgickým zákrokem došlo ke ztrátě krve, nastalo již za dva dny zvýšení na  $32,2 \pm 6,1$ . Později již k dalšímu výraznějšímu vzestupu nedocházelo a čtvrtý den

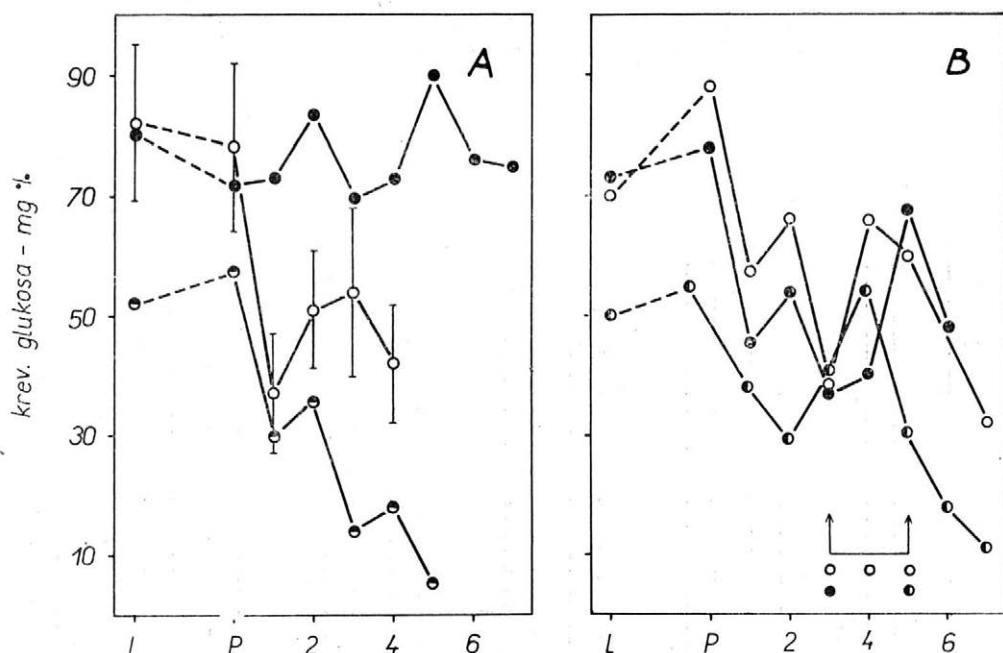
byla hematokritová hodnota  $32,5 \pm 6,0$ . Maximální individuální zvýšení o 10 volumnových procent erytrocytů bylo naměřeno u telete č. 23 tři dny po bilaterální adX.

Ztráta plasmy vypočtená na základě uvedených změn hematokritových hodnot činila u telat po oboustranné adX téměř 25 %. Stupeň dehydratace byl orientačně ověřen i stanovením obsahu celkových bílkovin krevního séra refraktometricky. Ztráta vody krevní plasmy, vypočtená podle Oplištila a Maška (1968), činila za první čtyři dny 12 %, v posledních dnech života až 20 %.

Thornův test, provedený 2. až 5. den, v jednom případě 7. den po bilaterální adX, byl ve všech případech negativní. Největší průměrné snížení počtu Eo, zaznamenané za dvě a půl hodiny, činilo pouze 13 % výchozí hladiny.

Účinek substituční terapie na hematologické hodnoty se projevil po aplikaci prednisonu, popřípadě zároveň s NaCl, přechodným snížením počtu Eo u všech telat a nepravidelným zvýšením N, popřípadě poklesem Ly. Po dvoudenním podávání samotného NaCl došlo u telete č. 23 ke snížení hematokritové hodnoty z 42 na 39.

Biochemické změny odehrávající se v krvi telat po odstranění nadledvin byly výrazné. Hladiny krevní glukózy ukazuje obr. 1. U všech telat došlo již do 24 hodin po bilaterální, ne však po unilaterální adX, k prudkému, statisticky průkaznému ( $P < 0,01$ ) poklesu. Snižující se trend byl zpravidla v následujících



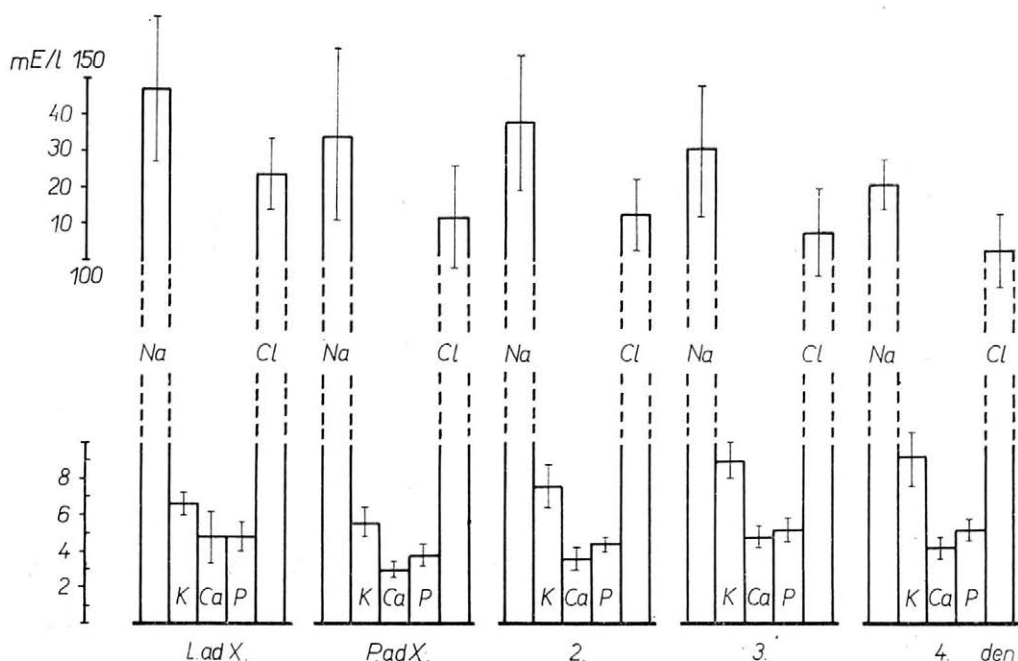
1. Glykémie u telat v době (na ose x) před levostrannou (L) a pravostrannou (P) adrenalectomií a v následující dny

- A ○---○ 4 telata substitučně neovlivněná (průměry se směrodatnou odchylkou)  
●---● tele kontrolní  
●---● tele č. 23 dostalo NaCl 3. a 4. den
- B ○---○ telata č. 16 a 22 dostala prednison 3.—5. den  
●---● tele č. 13 dostalo prednison + NaCl 3. den  
●---● tele č. 21 dostalo prednison + NaCl 5. den

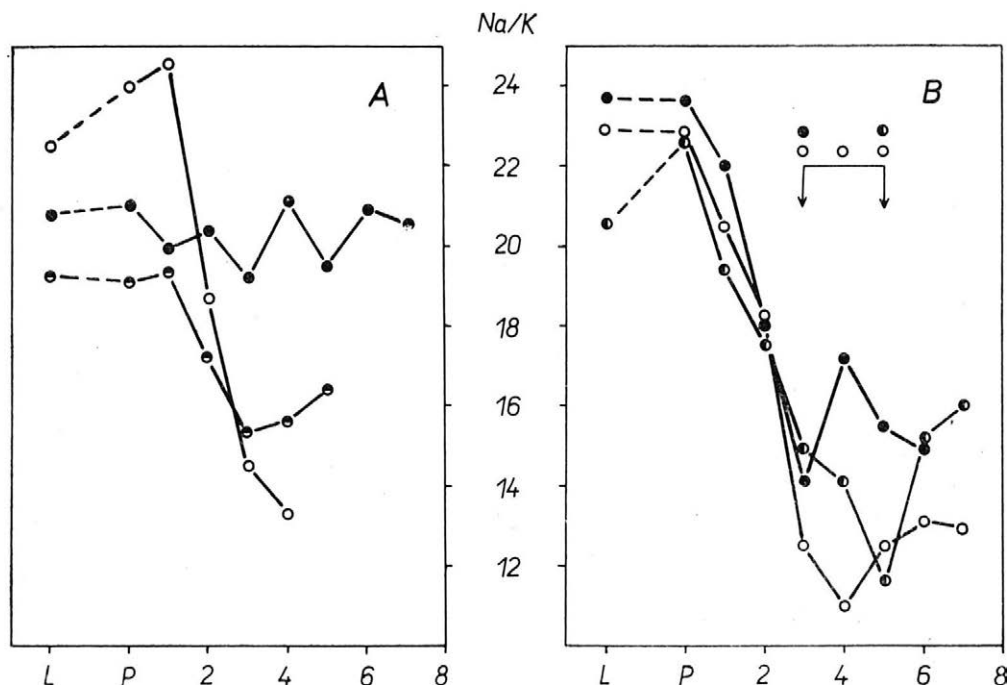
dvou dnech přerušen, rozdíl proti výchozí hladině však byly druhý a čtvrtý den statisticky průkazné ( $< 0,05$  a  $< 0,01$ ). Terminální hodnoty svědčí pro výraznou hypoglykémii, s minimem 5 mg %. Po aplikaci prednisonu se glykémie přechodně zvýšila s výjimkou telete č. 21, které jej dostalo až pátý den.

Vývoj změn v hladinách hlavních elektrolytů v krevním séru telat po adX ukazuje obr. 2. Po jednostranné adX došlo k signifikantní hypochlorémii doprovázené mírnou hypofosforémií. V průběhu prvních čtyř dnů po oboustranné adX převládal nález stupňující se hyperkalémie s hypochlorémií, jež jsou již od druhého dne signifikantní. Hyponatrémie dosáhla průkaznosti až čtvrtý den. Hladiny kostitvorných minerálů (Ca a P anorg.) po oboustranné adX nevykazovaly v průběhu prvních čtyř dnů signifikantních změn. Při substituční terapii upravila aplikace chloridu sodného částečně nebo zcela hyponatrémii a hypochlorémii, avšak jen při současném podání s prednisonem snížila zvýšenou hladinu draslíku. Nejméně přispěl k normalizaci hlavních elektrolytů krevního séra samotný prednison.

Z biologicky významných ukazatelů získaných výpočtem se jeví nejvhodnější poměr Na/K, který se prudce snižoval již v prvních dnech po bilaterální adX. Jak je vidět z obr. 3, lze nepříznivému poklesu tohoto závažného ukazatele minerál-kortikoidní insuficience nadledvin zabránit nejúčinněji aplikací prednisonu současně s NaCl, popř. samotným NaCl. Poměr K/Ca měl po adX tendenci ke zvýšení. Zvýšil se však též u telat, jimž byl aplikován prednison nebo NaCl samostatně. Ke snížení tohoto poměru došlo po aplikaci prednisonu zároveň s NaCl. Iontový součin Ca  $\times$  P anorg. nejevil po adX významnějších rozdílů. Po substituci prednisonem s NaCl bylo zaznamenáno jeho markantní



2. Ionogramy vyjadřující dynamiku změn hlavních elektrolytů v krevním séru telat po unilaterální (L) a bilaterální (P) adrenalectomii (průměry se směrodatnými odchylkami)



3. Poměr Na/K krevního séra u telat v době (na ose x) před levostrannou (L) a pravostrannou (P) adenalektomií a v následující dny. Legenda jako u obr. 1

zvýšení, vyvolané neobvykle vysokou sérovou koncentrací Ca. Naproti tomu aplikace samotného NaCl vedla k poklesu. Poměr Na/Cl měl po adX tendenci k mírnému a značně rozkolísanému poklesu. Opět jediné aplikace prednisonu současně s NaCl upravila tuto změnu takřka na normální hodnotu.

Zjišťováním hladiny nebiřkovinného N v séru telat po adX byl prokázán vznik urémie. Koncentrace N res., pohybující se před adX kolem 35 mg %, se v průběhu prvních čtyř dní po adX zvýšila téměř na 50 mg % a v posledních dnech dosahovala hodnot blízkých se 100 mg %. Substituční terapií nebyla tato progresivní změna ovlivněna.

## DISKUSE

Získané výsledky ukazují, že nadledviny u sajících telat jsou pro život vysoce důležité a organismus je na nedostatek korových hormonů velmi citlivý. Vyvolaná adrenokortikální insuficience se projevuje poměrně velmi brzy. Významné je, že již odnětí jedné nadledviny mělo vliv na krevní obraz a bylo naznačeno i v počínající změně sérových chloridů. Telata žila po bilaterální adX pouze čtyři až šest dní, tedy podstatně kratší dobu než zjistili Dvořák, Gilka a Věžník (1968) u sajících selat. Poněkud starší telata v experimentu Estergreena a Van Demarka (1961) žila po přerušení podávání steroidů a NaCl 6 a 7 dní. V žádném případě nebyla zjištěna při sekci uhynutých nebo *sub finem* vykrvených telat přítomnost akcesorní nadledvinové tkáně, jak na to u skotu upozornil Forenbacher (1967). Absolutní insuficienci potvrzují též negativní Thornovy testy.

Klinické příznaky adrenokortikální insuficience u telat odpovídají v podstatě symptomům pozorovaným i u jiných živočišných druhů, jak o tom bylo detailněji diskutováno v souvislosti s výsledky dosaženými po adX selat (Dvořák, Gilka a Věžník 1968). Zajímavé je, že u telat se hypotermie vyskytovala jako časný příznak, zatímco u selat byla zjištěna až v terminálním stadiu.

Taktéž zjištěné hematologické a biochemické změny jsou v hlavních rysech v souladu s dosud popsány. Krevní glukóza u selat (Oplištil, Dvořák 1968) nevykazovala podstatných změn; byla stanovena antronovou metodou. Hypoglykémii u telete uvádí též Balfour (1962), avšak ve výrazném stupni jen v první den po adX a pak v terminálním stadiu; krmení působilo mnohem větší vzestup krevní glukózy než u normálního telete. Poměr Na/K byl u našich telat více snížený než v pokusu Estergreena a Van Demarka (1961). Vliv nadledvin na homeostázi konstitutivních minerálií není dosud zřejmě zcela jasný a také naše výsledky, zvláště ve vztahu k aplikaci prednisonu, nejsou jednotné. Canas a kol. (1967) udávají hypokalcemický účinek steroidů a snížení koncentrace fosforu v krevním séru po adX, naproti tomu Hořejší a kol. (1963) uvádějí možnost mobilizace Ca z kostí účinkem glukokortikoidů a Forenbacher (1967) zjistil při experimentální hypoadrenii sklon k hyperfosfátémii.

Na těžké poruchy organismu telat po adX ukazují též pokusy se substituční terapií. Estergreenovi a Van Demarkovi (1961) se nezdánilo zlepšit moribundní stav telat po adX i. m. steroidní terapií. Účinná však byla infúze glukózy ve fyziologickém roztoku. Naše poznatky svědčí o uspokojivém působení prednisonu, především současně s NaCl. V použitých dávkách zlepšily klinický stav a prodloužily život telat mimo dobu podávání nejméně ještě o další den. Nestáčily však většinou k úplné normalizaci zvláště biochemických ukazatelů. Je třeba upozornit, že samotný prednison má ve srovnání s desoxykortikosteronem jen nepatrnou mineralokortikoidní aktivitu, zato však 3,5krát vyšší glukokortikoidní aktivitu, než má kortisol. Telata ihned po provedení adX udrželi Estergreen a Van Demark (1961) v normálním stavu dávkou 25 mg kortison-acetátu nebo 5 mg prednisonu, plus 5 mg desoxykortikosteron acetátu (DCA) na 100 lb. ž. v. denně nebo každý druhý den. Parker (1968) udržoval dvě telata aplikací 25 mg nebo 12,5 mg hydrokortisonu dvakrát denně s 2 x 5 g NaCl a další tele po předchozím ošetřování hydrokortisonem a NaCl od 8. do 16. dne po operaci jen 3 mg DCA a 2 x 2 g NaCl, aniž by došlo k adrenální krizi. Johnson a Flamboe (1963) zjistili, že minimální uchovací dávky po adX jsou 12,5 mg kortisonu plus 2,5 mg DCA na 100 lb ž. v., což odpovídá literárním údajům i pro jiné přežvýkavce.

Je zřejmé, že mnohem snazší je udržovat zvířata hned od provedené adX, než je terapeuticky ovlivňovat až v moribundním stadiu. Svědčí pro to též údaj Estergreena a Van Demarka (1961), že telata po adX byla zjevně normální i bez aplikace steroidů při volném zkrmování NaCl, jehož příjem byl asi čtyřikrát větší než u normálního telete. Naproti tomu v našem případě aplikace samotného NaCl neměla terapeutický účinek na celkový klinický stav, ačkoliv upravila vzniklou hyponatrémii a hypochlorémii. Další zhodnocení bude provedeno v následujících sděleních po posouzení dalších změn, které byly po adX telat zjišťovány.

Je však třeba upozornit ještě na jistou shodu biochemického obrazu experimentální adrenální insuficience s biochemickými nálezy charakterizujícími fázi

progresivní dehydratace vedoucí k celkovému oběhovému selhání, jak je popsali Oplištil a Salajka (1969) v modelovém pokuse s experimentální kolinfekcí u novorozených telat a Oplištil (1969) při průjmech telat ve velkokapacitních teletnicích. Již při předběžném hodnocení se nelze ubránit dojmu, že toto stadium průjmového onemocnění u telat úzce souvisí s narušením funkce kůry nadledvin, jak tuto možnost naznačili Roy a kol. (1959).

Technická spolupráce: H. Hornichová, V. Dyčková, S. Adamíková

## Literatura

- BALFOUR W. E., 1962, The adrenal cortex in domestic animals. *Brit. med. Bul.*, 18 : 114-116.
- CANAS F. M., BERGSTROM W. H., CHURGIN S. J., 1967, Effects of the adrenal on calcium homeostasis in the rat. *Metabolism*, 16 : 670-675.
- CUPPS P. T., FOWLER M. E., TURK R. M., BRIGGS J. R., 1960, Effects of adrenalectomy in the bull. *J. Animal Sci.*, 19 : 1319.
- DVOŘÁK M., GILKA F., VĚZNÍK Z., 1968, Adrenalektomie u selat: klinický, hematologický a patologicko morfologický obraz. *Docum. Vet.*, 6 : 229-240.
- ESTERGREEN V. L., VAN DEMARK N. L., 1961, Adrenalectomy of the calf and its effects on various blood constituents. *J. Dairy Sci.*, 44 : 928-936.
- FISHER E. W., 1965, Death in neonatal calf diarrhoea. *Brit. vet. J.*, 121 : 132-138.
- FORENBACHER S., 1967, Die Reaktionsfähigkeit der Nebennierenrinde einiger Haustierarten unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. *Zbl. Vet. Med.*, A, 14 : 285-301.
- HOLM L. W., PARKER H. R., GALLIGAN S. J., 1961, Adrenal insufficiency in post-mature Holstein calves. *Am. J. Obst. Gynec.*, 81 : 1000-1008.
- HOREJŠÍ J. a kol., 1963, *Základy klinické biochemie ve vnitřním lékařství*. Praha, 576 s.
- JOHNSON R. M., FLAMBOE E. E., 1963, Determination of minimal maintenance levels of adrenal steroids in the bilaterally adrenalectomized goat. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 112 : 853-856.
- KERPEL-FRONIUS E., 1959, *Pathologie und Klinik des Salz- und Wasserhaushaltes*. Budapest, 678 s.
- LINDT S., 1962, Die Morphologie der Nebennieren bei Rindeninsuffizienz unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse bei Tieren. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 69 : 1-7.
- MOLL T., 1956, Massive adrenal hemorrhage in young calves. *J. Amer. vet. Med. Assoc.*, 129 : 401-404.
- MOLL T., 1965, The pathogenesis of diarrhea in newborn calf, with special reference to physiologic functions and environmental conditions. *J. Amer. vet. Med. Assoc.*, 147 : 1364-1366.
- OPLIŠTIL M., 1969, Sledování hlavních elektrolytů krevního séra při průjmech telat. I. Poruchy minerálního a vodního metabolismu. *Docum. Vet.*, 7 : v tisku.
- OPLIŠTIL M., DVOŘÁK M., 1968, Adrenalektomie u selat: změny biochemického složení krevního séra. *Docum. Vet.*, 6 : 241-249.
- OPLIŠTIL M., MAŠEK J., 1968, Biochemické studie při průjmech telat. I. Poruchy elektrolytového metabolismu. *Docum. Vet.*, 6 : 43-52.
- OPLIŠTIL M., SALAJKA E., 1969, Experimental *E. coli* infection in calves. IV. Alterations in blood serum electrolytes. *Docum. Vet.*, 8 : v tisku.
- PARKER H. R., 1968, Relationship between the thyroid and adrenal glands of newborn dairy calves: histopathologic considerations. *Am. J. vet. Res.*, 29 : 47-64.
- PIRALIŠVILI I. S., 1962, K metodike podšeta eozinofilov v periferičeskoj krvi. *Labor. Délo*, 8, 3 : 20-22.
- ROY J. H. B., SHILLAM K. W. G., HAWKINS G. M., LANG J. M., 1959, The effect of white scours on the sodium and potassium concentration in the serum of newborn calves. *Brit. J. Nutrit.*, 13 : 219-226.
- VRZGULA L., 1964, Iónové poruchy v krvnom sére teliat pri hnačkách a ich terapia. *Veterinárství*, 14 : 245-249.

Došlo dne 14. 10. 1968

ДВОРЖАК М., ОПЛИШТИЛ М., ПАТКА Й., ВЕЖНИК З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Клинические, гематологические и биохимические изменения при адrenaлeктомии у телят. Вет. Мед. (Прага) 14 (6): 357-367, 1969.

Двухсторонняя адrenaлeктомия была проведена у 9 телят в возрасте 27—47 дней. Из клинических признаков, которые начали проявляться уже на третий день, самыми отчетливыми были гипотермия, летаргия, мышечная адинамия, анорексия, дегидратация и брадикардия с аритмией. Были также отмечены эозинофилия, лимфоцитоз и повышение гематокрита. Были установлены статистически достоверные гиперкалемия, гипохлоремия и гипонатремия. Отношения Na/K резко снизилось почти наполовину исходной величины. Уровень глюкозы крови быстро понижался и случаи самой острой гипогликемии сопровождались конвульсиями. Концентрация небелкового азота в кровяной сыворотке повысилась почти в три раза. Уже после удаления одной надпочечной железы повышалось количество эозинофильных лейкоцитов и начал понижаться уровень хлоридов кровяной сыворотки: Двусторонне адrenaлeктомизированные телята жили 4—6 дней. Продления жизни и улучшения клинических симптомов было достигнуто при применении 5 мг преднизона, особенно при одновременном применении 10 г хлорида натрия в сутки, но не только одного хлорида натрия. Обращается внимание на сходность симптомов и изменений биохимических показателей, вызванных экспериментальной адrenaлeктомической недостаточностью, с конечной стадией желудочно-кишечных заболеваний телят.

адrenaлeктомическая недостаточность; гипотермия; анорексия; дегидратация; летаргия; эозинофилия; лимфоцитоз; гиперкалемия; гипохлоремия; гипонатремия; пониженные отношения Na/K; гипогликемия; уремия; субституционная терапия; преднизон; хлорид натрия

DVOŘÁK M., OPLIŠTIL M., PATKA J., VĚŽNÍK Z. (Research Institute of Veterinary Medicine, Brno, Czechoslovakia). *The Clinical, Hematological, and Biochemical Changes Caused by Adrenalectomy in Calves*. Vet. Med. (Praha) (6): 357-367, 1969.

A bilateral adrenalectomy was carried out in 9 calves aged 27—47 days. The following clinical symptoms, occurring already in 3 days, were most marked: Hypothermia, lethargy, muscular adynamia, anorexia, dehydration, and bradycardia connected with arrhythmia. Eosinophilia, lymphocytosis, and an increase of the hematocrit value were observed. A statistically significant hyperkalemia, hypochloremia and hyponatremia were found. The Na/K ratio rapidly decreased to a half of the initial value. A rapid decrease was observed also in the blood glucose level, and the cases of the most pronounced hypoglycaemia were accompanied with convulsions. The concentration of non-protein nitrogen in the blood serum showed even a three-fold increase. It was already after only one suprarenal gland was removed that the number of eosinophilic leucocytes came to increase, and the level of serum chlorides began to decrease. The bilaterally adrenalectomized calves lived for 4—6 days. A longer life and better clinical symptoms were achieved by means of the application of 5 mg of prednisone, particularly when combined with a simultaneous application of 10 mg of NaCl daily. (When NaCl was applied alone, no such effect occurred). A special notice is devoted to the similarity of the symptoms as well as of the changes in the biological indices evoked by an experimental adrenocortical insufficiency, to those observed in the terminal stage of diarrhoea in calves.

adrenocortical insufficiency; hypothermia; anorexia; dehydration; lethargy; eosinophilia; lymphocytosis; hyperkalemia; hypochloremia; hyponatremia; a decreased Na/K ratio; hypoglycaemia; uremia; substitution therapy; prednisone; sodium chloride

DVOŘÁK M., OPLIŠTIL M., PATKA J., VĚŽNÍK Z. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Klinische, hämatologische und biochemische Veränderungen bei der Adrenalectomie der Kälber*. Vet. Med. (Praha) 14 (6): 357-367, 1969.

Bilaterale Adrenalectomie wurde bei 9 Kälbern im Alter von 27—47 Tagen durchgeführt. Die ausgeprägtesten klinischen Symptome, die bereits am dritten Tag zum Vorschein kamen, waren die folgenden: Hypothermie, Lethargie, Muskel-Adynamie, Anorexie, Dehydratation und Bradykardie mit Arrhythmie. Eosinophilie, Lymphozytose und Erhöhung des Hämatokritwertes konnte verzeichnet werden. Es wurde eine statistisch signifikante Hyperkalämie, Hypochlorämie und Hyponatriämie ermittelt. Das Verhältnis Na/K senkte sich heftig fast um die Hälfte des Ausgangswertes. Auch das Blutglukoseniveau wurde rasch herabgesetzt und Fälle der ausgeprägtesten Hypoglykämie wurden durch Konvulsionen begleitet. Die Konzentration des eiweißfreien

Stickstoffes im Blutserum erhöhte sich bis um das Dreifache. Bereits nach der Entnahme von einer Nebenniere erhöhte sich die Anzahl eosinophiler Leukozyten und das Niveau der Serumchloride begann sich zu senken. Die bilateral adrenaletomierten Kälber lebten 4—6 Tage. Eine Verlängerung des Lebens und Verbesserung der klinischen Symptome konnte durch die Applikation von 5 mg Prednison erzielt werden, u. zw. besonders bei einer gleichzeitigen Verabreichung von 10 g NaCl täglich, jedoch nicht von NaCl allein. Es wird auf die Ähnlichkeit der Symptome und Veränderungen biochemischer Kennwerte, die durch experimentelle adrenokortikale Insuffizienz hervorgerufen werden, mit denen, die in terminalem Stadium der Durchfallerkrankungen bei Kälbern erscheinen, aufmerksam gemacht.

adrenokortikale Insuffizienz; Hypothermie; Anorexie; Dehydratation; Lethargie; Eosinophilie; Lymphozytose; Hyperkalämie; Hypochlorämie; Hyponatriämie; herabgesetztes Na/K-Verhältnis; Hypoglykämie; Urämie; Substitutionstherapie; Prednison; Natriumchlorid

---

*Adresa autorů:*

MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., MVDr. Miroslav Oplištil, CSc., MVDr. Ján Patka, MVDr. Zdeněk Věžník, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno-Medlánky  
Ředitel: Prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc.

---

## Vědecké časopisy

### ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÉ

**uveřejňují** původní vědecké práce o vyřešených výzkumných úkolech ze všech oborů zemědělství a lesnictví. Dále otiskují vědecká pojednání, studie a přehledy zahraniční literatury o vědeckých problémech. Práce z různých výzkumných pracovišť vztahující se k jednomu problému vycházejí v monotematických číslech.

V roce 1969 vycházejí:

|                                |                                  |
|--------------------------------|----------------------------------|
| Rostlinná výroba . . . . .     | 12 × ročně, předplatné Kčs 216.— |
| Živočišná výroba . . . . .     | 12 × ročně, předplatné Kčs 120.— |
| Veterinární medicína . . . . . | 12 × ročně, předplatné Kčs 120.— |
| Zemědělská ekonomika . . . . . | 12 × ročně, předplatné Kčs 120.— |
| Zemědělská technika . . . . .  | 12 × ročně, předplatné Kčs 120.— |
| Sborník ÚVTI . . . . .         | 12 × ročně, předplatné Kčs 120.— |
| Lesnictví . . . . .            | 12 × ročně, předplatné Kčs 144.— |

#### Vědecký časopis

SCIENTIA AGRICULTURAE BOHEMOSLOVENICA je určen pro zahraničí. Otiskuje takové vědecké práce a studie, které jsou československým přínosem k celosvětovým vědním zemědělským poznatkům. Články jsou otiskovány v angličtině, ruštině, němčině a francouzštině. Vychází čtvrtletně, celoroční předplatné Kčs 40.—

VĚSTNÍK ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÉ je orgánem ČSAZ, národních akademií zemědělských a jejich výzkumných ústavů. Pravidelně informuje o problémech zemědělské vědy a výzkumu, jež jsou projednávány na zasedáních pléna, předsednictva, odborů a komisí Akademií, na konferencích a symposiích. Přináší referáty z mezinár. kongresů a výsledné zprávy ze zahraničních studijních cest. V četných rubrikách uveřejňuje materiály o výsledcích a plánech činnosti jednotlivých výzkumných ústavů a pracovišť. Věstník ČSAZ vychází měsíčně, celoroční předplatné Kčs 96.—

**Objednávky zasílejte na**

**ČSAZ - ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ,**

**Slezská 7, Praha 2 — Vinohrady**

# POSTIŽENÍ JATER A NĚKTERÝCH JINÝCH ORGÁNŮ PŘI INVAZI MOTOLICE FASCILOIDES MAGNA (BASSI, 1875)

K. Blažek

Parazitologický ústav ČSAV, Praha

---

BLAŽEK K. *Postižení jater a některých jiných orgánů při invazi motolice Fascioloides magna (Bassi, 1875)*. Vet. Med.(Praha) 14 (6) : 369-374, 1969.

Patogenita motolice *Fascioloides magna* je podstatně větší než patogenita jiných druhů motolic, parazitujících v játrech hospodářských zvířat v mírném podnebním pásmu. Je to způsobeno tím, že napadeným orgánem migruje velmi dlouho i pohlavně dospělá motolice, živící se převážně krví hostitele. S rozsáhlou destrukcí souvisí pak poměrně těžké změny na cévním systému napadeného orgánu. Pigment, který se vyskytuje téměř vždy při invazi této motolice, patří mezi hematiny a obsahuje maskované železo. Popsané patologické změny jsou v komplexu natolik typické pro tuto invazi, že etiologickou diagnózu lze stanovit již při jejich zjištění i tehdy, když snad samotný cizopasník nebyl nalezen a určen.

*Fascioloides magna* (Bassi, 1875); patogenita; zvěř a hospodářská zvířata

---

Motolice velká (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) je častým parazitem jater u cervidů a bovidů ve Spojených státech severoamerických a v Kanadě, byla však nalezena i v Evropě, kam byla zavlečena dovozem nakažených jelenů wapiti (Erhardová 1961). Vyskytuje se zde především u jelení, daňčí a srnčí zvěře a její nález u skotu v Evropě ohlásil pouze Garzia (1935) z Itálie a Záhoř a kol. (1966) z Československa. V Československu je fascioloidóza rozšířena u spárkaté zvěře v jižních Čechách, odkud pochází i Záhořův nedávný nález motolice velké u skotu z výkrmu. Známe ji však také z jiných lokalit a její rozšíření nelze již dnes podceňovat. Motolice se výborně přizpůsobila novým druhům meziphostitelů, a není proto vyloučeno, že se v krátké době objeví i u skotu ve větší míře, než je dosud hlášeno.

Znalost patologie fascioloidózy je proto významná pro včasnou diagnostiku této invaze. V tomto sdělení shrnuji poznatky z vlastního srovnávacího studia morfologie spontánních i experimentálních invazí zvěře jelení (20) srnčí (6), daňčí (3), kamzičí (1), ovce (2) a skotu (1). U skotu, jednoho z daňků, kamzice a jehňat šlo o invazi experimentální, u ostatních zvířat u spontánní.

## MATERIÁL A METODIKA

Excize ze změněných orgánů pitvaných zvířat byly běžně fixovány v 10% formolu. Z některých případů, a to vesměs z experimentu, byla současně provedena fixace v neutrálním formolu, Zenkerově a Bouinově tekutině, nebo byly kousky tkáně ihned při pitvě zmrazeny v alkoholu se suchým ledem pro pozdější

histochemické vyšetření. Excize byly dále zpracovány parafinovou technikou (s výjimkou histochemických reakcí) a k barvení řezů z nich zhotovených bylo použito těchto metod: hemalaun-eosinu, barvení podle van Giesona, trichromu podle Massona, barvení na mucin, metoda k průkazu elastických struktur podle Weigerta, Perlsova reakce, impregnace retikulinových vláken podle Gomoriho, PAS podle Mac Manuse a reakce na fibrin podle Weigerta a Malloryho. Pro histochemické studium pigmentu byla uskutečněna řada reakcí, jejichž výčet je uveden v jiné práci (Blažek, Gilka 1968).

## VÝSLEDKY

Játra jsou při invazi motolice velké obvykle zvětšena, jsou na povrchu i v hloubce černohnědé až černě skvrnitě pigmentovaná a je v nich různý počet cystoidních dutin (pseudocyst). Ty se objevují většinou teprve na řezu; některé však leží v nevelké hloubce a povrch jater polokulovitě vyklenují. Tato místa fluktuují. Pseudocysty jsou vyplněny řídkou krvavou tekutinou, nebo častěji hustou tekutinou tmavohnědé barvy, v níž je v mnoha případech jedna nebo i více motolic. Na řezu játry najdeme i menší kavitace s inspisovaným, drobným, černě zbarveným obsahem, ve kterém jsou masy vajíček. Kromě pseudocyst bývají v jaterním parenchymu nepravidelně probíhající migrační kanály jako rozsáhlé hemoragie. U srnčí zvěře ovládají makroskopii jater právě tyto hemoragie v místech migračních chodeb a tvorba cystoidních dutin je spíše výjimečná a jen náznaková (obr. 1).

Někdy jsou touto motolicí napadeny i plíce, kde je lobární pneumonie s fibrinózní pleuritidou nebo fibrózními pleurálními synechiemi. Do této lokalizace se motolice dostávají patrně většinou přes bránici, o čemž svědčí nálezy zánehtlivých změn v její svalové části a chronický zánět sérózy thorakální i abdominální plochy.

Na viscerálním listu pobřišnice jsou černé pigmentové skvrny, mizní uzliny portální jsou vesměs zvětšené a také pigmentované.

V histologickém obraze invaze motolice velké lze všeobecně popsat několik typů poškození: traumatickou destrukci tkáně napadeného orgánu, nekrózu a granulační tkáň různého stáří.

Migrační kanály jsou v podstatě rozsáhlé hemoragie v místech mechanické destrukce tkáně motolicí. Je v nich motolice (nedospělá nebo kladoucí již vejce), masa erytrocytů, eosinofilní granulocyty a trosky jaterních buněk. V bezprostředním okolí je úzká zóna nekrózy jaterních buněk a dále výrazná infiltrace trigonů eosinofily. Migrační kanálky se postupně demarkují fibroproduktivní granulační tkání. V některých řezech lze prokázat, že souvisí s lumenem cévy, kontinuita jejíž stěny byla mechanicky narušena (arozí).

Pseudocysty (v literatuře označované též jako cysty nebo kaverny) jsou v podstatě útvary, které vznikly demarkací laesí vyvolaných motolicí, když již její migrační aktivita poklesla. Stěna pseudocysty je tvořena granulační tkání z histiocytů a fibroblastů. V této chronické granulační tkáni je nevelká příměs hematogenního exsudátu s poměrně malým podílem eosinofilů. Jsou zde i šterbinovité žlučovody, je-li pseudocysta na periférii lobulu, což je při její velikosti téměř pravidlem. V pseudocystě jsou kromě motolice erytrocyty nebo směs erytrocytů a neutrofilních granulocytů, plazmatických buněk a makrofágů. V některých případech plazmatické buňky v pseudocystě, její stěně a okolí převládají.

Ve většině pseudocyst jsou masy vajíček motolice (obr. 2) a ve velkém množství černý pigment, o němž jsme prokázali, že patří mezi hematiny. Vajíčka najdeme i ve stěně pseudocysty (nebo migračního kanálu), obklopená shlukem leukocytů, mnohoadernými buňkami nebo vyzrálým vazivem, dále v interlobulárních a centrálních žilách a v rozšířených miznicích na periférii lobulu (obr. 6).

Při chronické invazi vazivová stěna pseudocysty hyalinizuje a někdy v ní dochází ke kalcifikaci nebo k tvorbě kostních lamel s naznačenou osteoklazií.

V širším okolí popsaných ložiskových změn v játrech je výrazná tkáňová i intravaskulární eosinofilie jen při čerstvé jaterní leasi. V protrahovaných případech s pseudocystami bez migrace parazita je infiltrace lymfoplasmocelulární a zůstává omezena na portobiliární prostory. V epitelu žlučových (a v případech pulmonální lokalizace motolice i v epitelu bronchů) jsme zjišťovali tzv. globulární leukocyty (Weill 1919). Jako reziduum po nedokonale vyhojené ztrátě parenchymu se objevuje naznačená fibróza až výrazná cirrhóza jater.

V marginálních splavech zvětšených mizních uzlin portálních je již zmíněný fascioloidózní pigment, a to hlavně v histiocytech a v některých případech vajíčka motolice nebo jejich zbytky (obr. 8).

Při pulmonální lokalizaci motolice jsou v plicní tkáni rozsáhlé hemoragie doprovázející migraci parazita a pneumonie s výraznou zánětlivou reakcí intersticia. V infiltrátu převládají eosinofily a jsou také častou příměsí exsudátu vyplňujícího alveoly.

Nápadná je reakce venózního a arteriálního systému jater a plic, napadených touto motolicí. Dochází k endo- a mesoflebitidě, zvláště interlobulárních žil, ne tak často k zánětu centrálních žil a trombóze. Charakter infiltrátu ve stěně cév je závislý na době a charakteru poškození jaterní (nebo plicní) tkáně. Může být téměř výhradně eosinofilní, jindy lymfo-plasmocelulární, nebo jde o proliferát histiocytární. Někdy se ovšem setkáme již jen s fibrózou intimy. Mizní cévy v játrech jsou široce rozevřené a v jejich luminu je kromě lymfocytů a eosinofilů nápadná přítomnost histiocytů s fascioloidózním pigmentem v plazmě, v některých případech i vajec motolice. U skotu jsme na periférii lobulu pozorovali excesivních proliferaci lymfatické tkáně kolem dilatovaných miznic a vajec (obr. 6).

## DISKUSE

Při invazi motolice *Fascioloides magna* u spárkaté zvěře, skotu a ovcí migruje jaterní nebo plicní tkáně také motolice již pohlavně zralá, na rozdíl od druhů *Fasciola hepatica* a *Dicrocoelium dendriticum*, které dosahují pohlavní zralosti teprve ve žlučovodech (Schumacher 1938, Urquhart 1954, Dow a kol. 1967). Vyvolávají v nich změny, zcela odlišné od změn při fascioloidóze. Z našich šetření vyplynulo, že cystoidní dutiny vznikají v parenchymu, že však většina z nich souvisí se žlučovody většího kalibru, ať již prostřednictvím malých žlučových, nebo tak, že stěna žlučového je podstatnou součástí stěny pseudocysty. Cholangiogenní původ pseudocysty dokazuje v některých případech nález zbytků žlučovodových žlázek a epitelu, charakteristického pro žlučové cesty. Někdy však dochází k poměrně časně demarkaci laese, vyvolané motolicí, takového druhu a intenzity, že dojde k obliteraci komunikace pseudocysty se žlučovodem nebo s další jeho částí, je-li pseudocysta divertiklem žlučového. To jsme viděli u experimentální fascioloidózy skotu, kdy po 8 mě-

sících od invaze byly fascioloidózní laese demarkovány osifikujícím vazivem a došlo k excesivní hyperplazii lymfatické tkáně v okolí vajec.

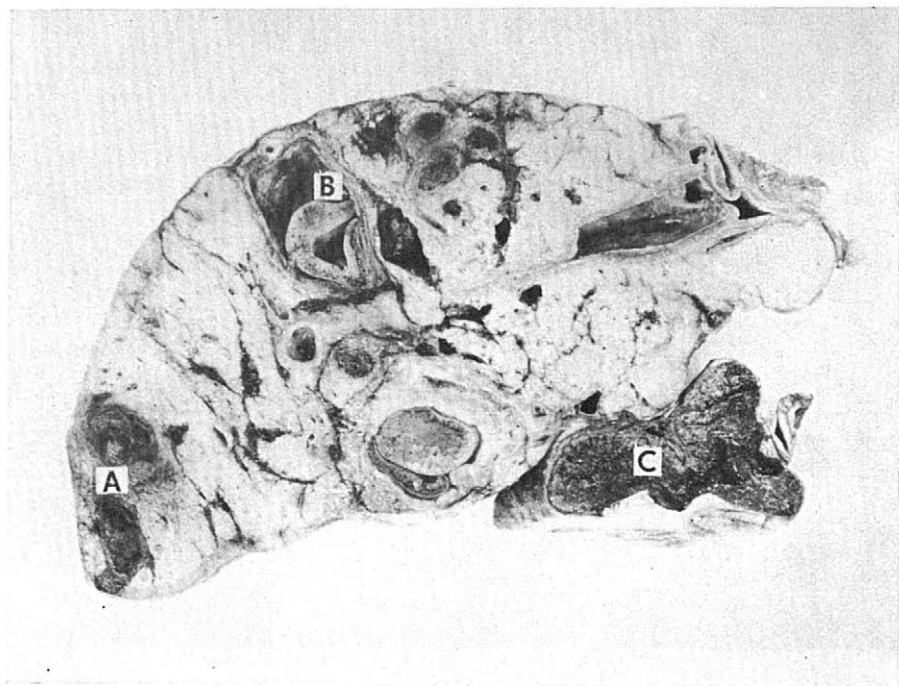
Zánětlivá infiltrace napadeného orgánu je v období aktivní migrace, tedy v období bouřlivého rozpadu bílkovin, převážně eosinofilní. V pozdějším období je nápadná účast lymfocytů a zejména plasmatických buněk, které jsou někdy dokonce výhradní složkou infiltrátu. Jejich přítomnost je asi v úzkém vztahu k přesunům sérových bílkovin. Je to v podstatě v soulase s dnešními názory na funkci eosinofilů (Pollicard, Collet 1961) a plasmatických buněk (Trautwein 1964). Výskyt globulárních leukocytů (Weill 1919), které jsme zjišťovali v epitelu bronchů a žlučovýchodů, je mnoha autory uváděn do vztahu k parazitární invazi (Kirkman 1950, Kent 1952, Whur 1966, Zipper 1966). Ví se, že obsahují globuliny (Dopson 1966, Carrová 1967). Otázky jejich vztahu k parazitární invazi všeobecně a otázky zákonitostí jejich výskytu však zasluhují dalšího studia. Při fascioloidóze jsme je totiž zjišťovali pouze u srnčí a daňčí zvěře.

Čerstvé patologické změny cévního systému jater a plic a rezidua po nich vznikají jednak sekundárně při rozsáhlé destrukci parenchymu, ale jsou také dokladem jisté afinity této motolice k cévám. Nepřekvapuje to, neboť tato motolice se živí převážně krví.

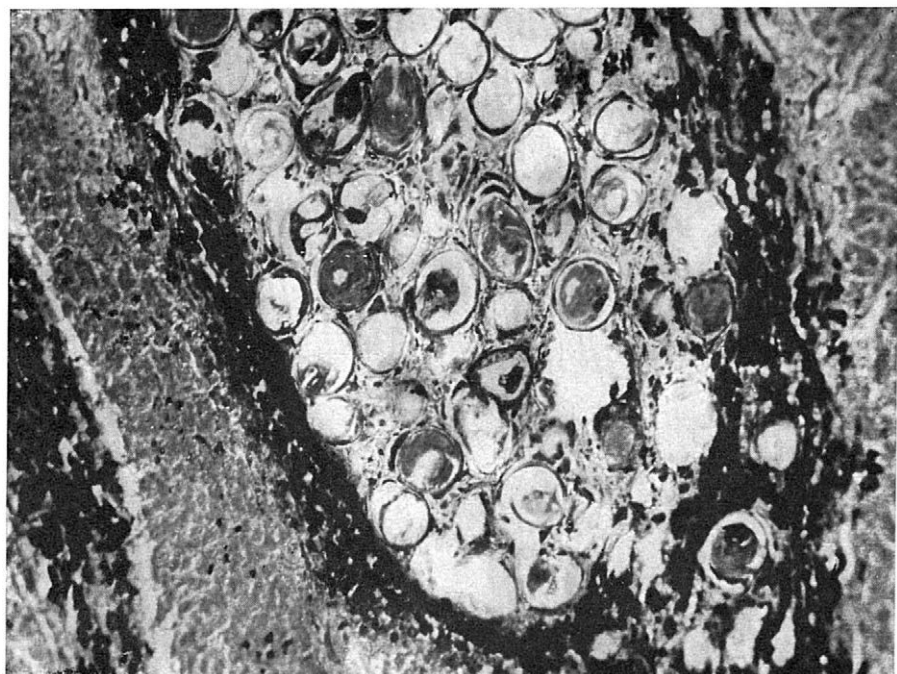
Při invazi *Fascioloides magna* je v patologických změnách ve většině případů zjišťován tmavohnědý až černý pigment. Je v plazmě histiocytů ve stěnách migračních kanálů a pseudocyst, v inispované mase, vyplňující některé pseudocysty, v jízvách, pojivu portobiliárních prostorů a ve splavech mizních uzlin portálních. Někteří autoři se domnívali, že jde o melanin (cit. Sinclair 1967); jiní vyslovili názor, že jde patrně o pigment hematogenní (Záhorský a kol. 1966), někteří na základě chemického rozboru extraktu (Campbell 1960). Histochemickým průzkumem pigmentu z patologicky změněných orgánů a motolice jsme prokázali, že tento pigment patří skutečně k hematinům, že obsahuje maskované železo a že se některými svými vlastnostmi liší od tzv. formolpigmentu a pigmentu malarického (Blažek, Gilka 1968). Domníváme se, že je motolicí vyvrhován jako odpadový produkt po strávení erytrocytů.

## Literatura

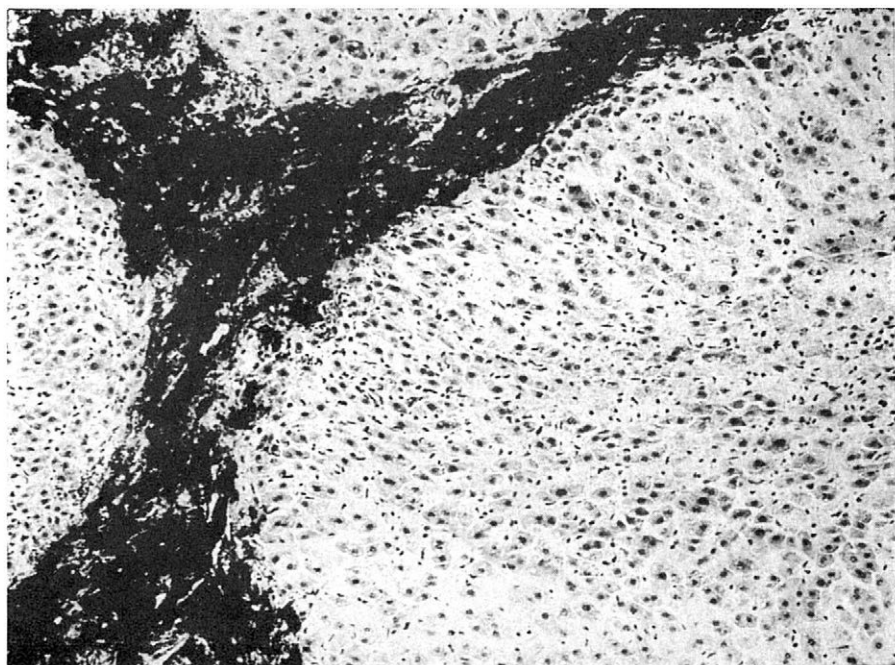
- BLAŽEK K., GILKA F., 1968, Příspěvek k poznání povahy pigmentu motolice *Fascioloides magna*. Folia parasitologica (Praha), v tisku.
- CAMPBELL W. C., 1960, Nature and possible significance of the pigment in fascioloidiasis. The Journal of Parasitology, 46 : 769-775.
- CARR E. K., 1967, Fine structure of crystalline inclusions in the globule leucocyte of the mouse intestine. J. Anat., 101 : 793-803.
- DOPSON C., 1966, Immunofluorescent staining of globule leucocytes in the colon of the sheep. Nature, 211 : 875 (cit. Carr 1967).
- DOW C., ROSS J., TODD J. R., 1967, The pathology of experimental fascioliasis in calves. J. comp. Path. 77 : 377-385.
- ERHARDOVÁ B., 1961, *Fascioloides magna* in Europe. Helminthologia, 3 : 91-106.
- GARZIA G., 1935, Un caso di distomatosi epatica da *Distomum magnum* (Bassi, 1875) nel bovino. Nuovo Ercolani 40 : 126-132.
- KENT J. F., 1952, The origin, fate and cytochemistry of globule leucocyte of the sheep. Anat. Rec., 112 : 91-116.
- KIRKMAN H., 1950, A comparative morphological and cytochemical study of globule leucocytes (Schollenleukozyten) of the urinary tract and possibly related cells. Amer. J. Anat., 86 : 91-131.



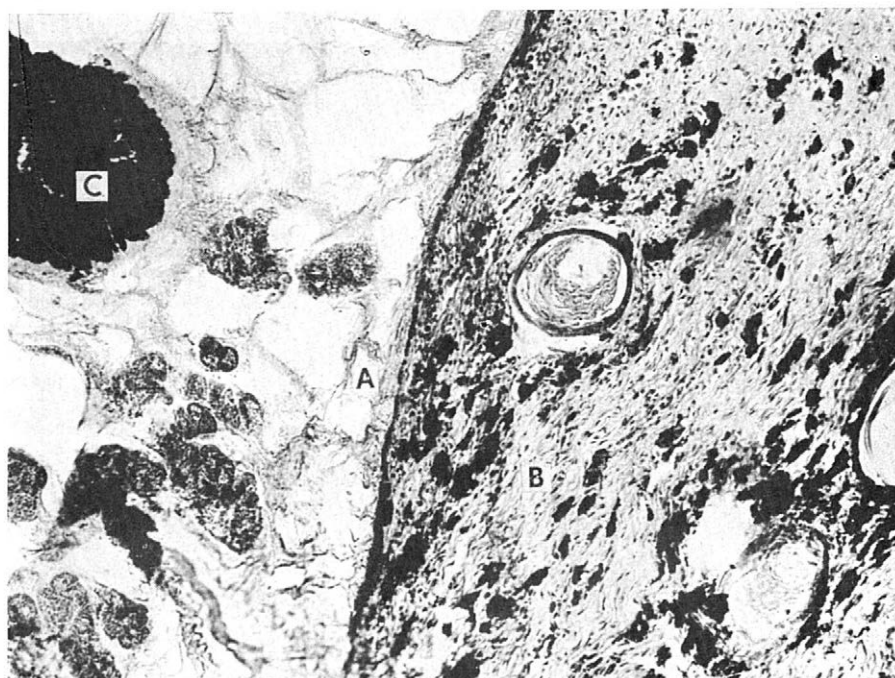
1. Řez játry daňky, napadenými motolicí velkou. A — hematomy, B — pseudocysta s motolicí, C — mizní uzlina portální



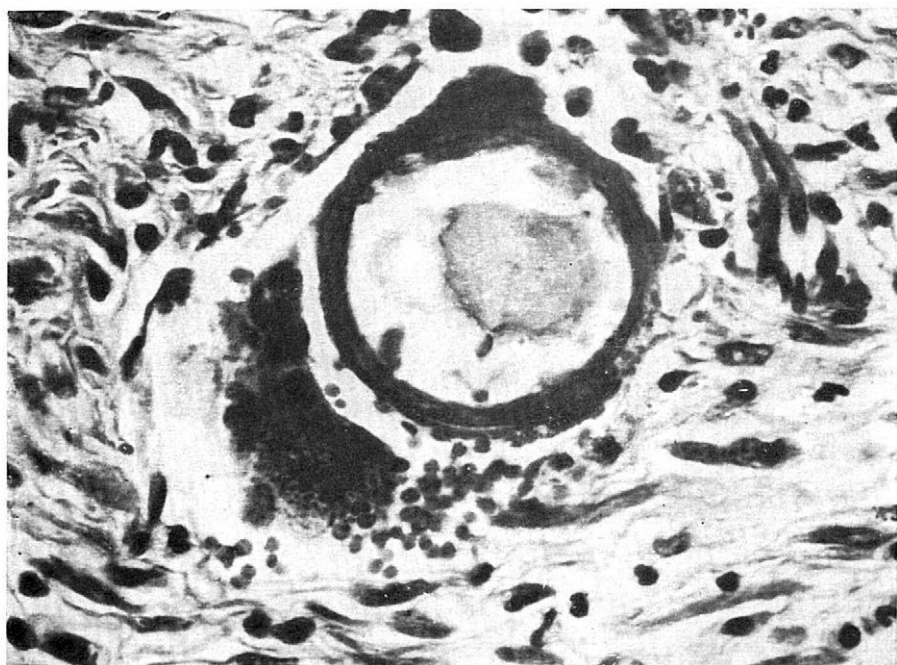
2. Játra jelena. Pseudocysta se silně pigmentovanou stěnou, obsahující četná vajíčka motolice *Fascioloides magna*. HE, 80X



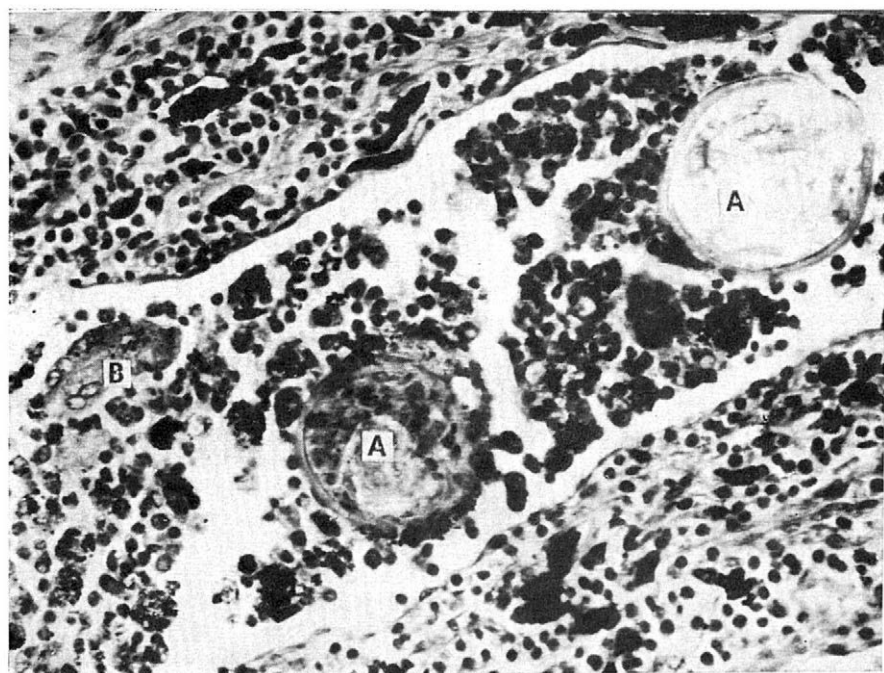
3. Játra jelena. Ve zmnoženém perilobulárním vazivu výrazná depozice fascioloidního pigmentu. HE, 135 X



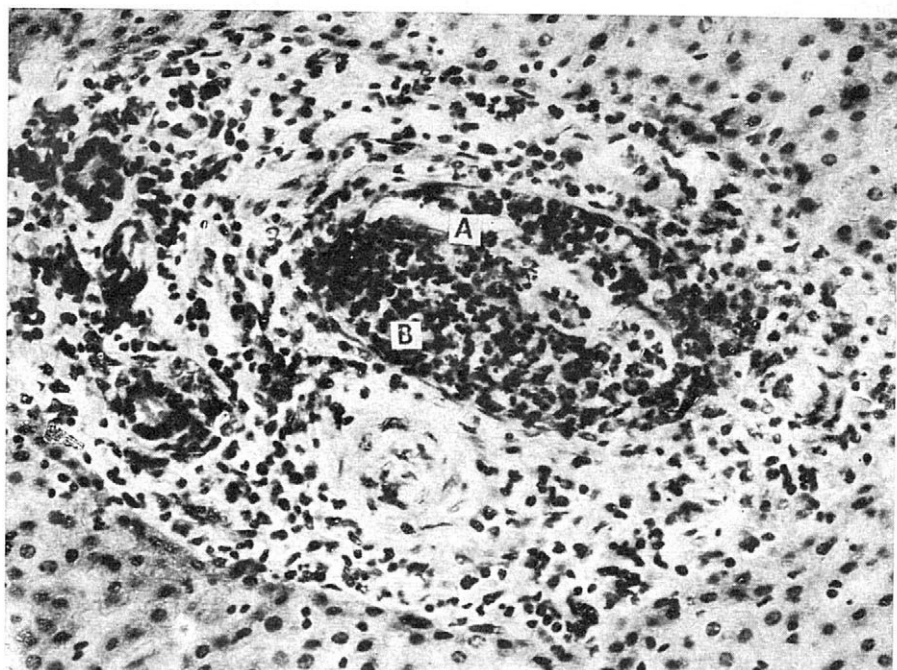
4. Část těla motolice (A) naléhající na vazivovou stěnu pseudocysty (B), v níž jsou uzavřena vajíčka a pigment. Ve střevě motolice (C) černý fascioloidní pigment — hematin. HE, 270 X



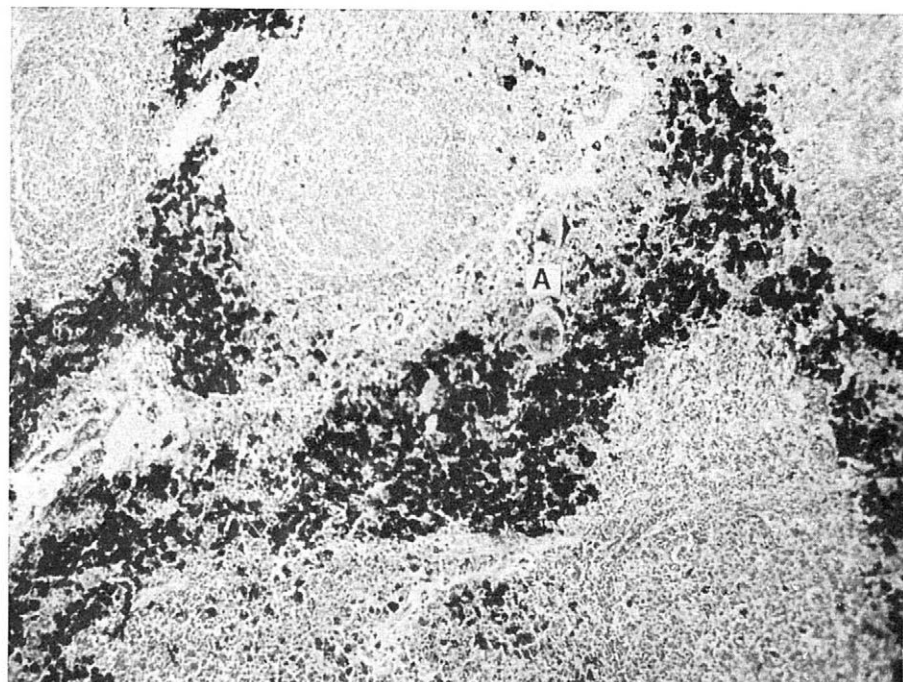
5. Vajíčko motolice ve stěně migračního kanálku, na něž naléhá mnohojaderná buňka s pigmentem v plazmě. V bezprostřední blízkosti vajíčka jsou také erytrocyty. HE, 600X



6. Detail dilatované lymfatické cévy z periferie jaterního lalůčku. V jejím luminu jsou vajíčka (A), leukocyty a makrofágy s pigmentem a ojedinělá vícejaderná symplazmata (B). Játro skotu, HE, 270X



7. Zbytek destruovaného vajíčka (A) v interlobulární véně, obklopený eosinofily (B). Lumen cévy je eosinofily zcela vyplněno. Játro laně. HE, 270X



8. Mízní uzlina portální, skot. V sinusech hojný pigment a ojedinělá vajíčka motolice F. m. (A). HE, 60X

- POLICARD A., COLLET A., 1961, Physiologie du tissu conjonctif normal et pathologique, Paris.
- SCHUMACHER W., 1938, Untersuchungen über den Wanderungsweg und die Entwicklung von *Fasciola hepatica* L. im Endwirt. Z. Parasitenkunde 10 : 608-643.
- SINCLAIR K. B., 1967, Pathogenesis of *Fasciola* and other liver-flukes. Helminth. Abstr. 36 (2) : 115-134.
- TRAUTWEIN G., 1964, Die Bedeutung der Plasmazellen als Antikörperbildner. Path. Vet., 1 : 423-453.
- URQUHART G. M., 1954, The rabbit as host in experimental fascioliasis. Exp. Parasit., 3 : 38-44.
- WEILL P., 1919, Über die leukozytären Elemente der Darmschleimhaut der Säugetiere. Arch. f. Mikr. Anat. u. Entwickl., 94 : 1-81, cit. Kent J. F. 1952.
- WHUR P., 1966, Relationship of globule leucocytes to gastrointestinal nematodes in the sheep, and *Nippostrongylus brasiliensis* and *Hymenolepis nana* infections in rats. J. Comp. Path., 76 : 57-65.
- ZÁHOŘ Z., PROKŠ C., VÍTOVEC J., 1966, Nález vajíček motolice *Fascioloides magna* (Bassi 1875) a fascioloidózních změn v játrech skotu. Vet. Med. (Praha), 11 : 397-402.
- ZIPPER J., 1966, Beitrag zur Frage der sogenannten Schollenleukozyten Zbl. f. Veterinärmedizin, 13 : 329-336.

Došlo dne 22. 10. 1968

БЛАЖЕК К. (Научно-исследовательский институт паразитологии ЧСАН, Прага, Чехословакия). Поражение печени и некоторых других органов при инвазии сосальщика *Fascioloides magna* (Bassi, 1875). Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 369-374, 1969.

Патогенность сосальщика *Fascioloides magna* гораздо выше патогенности других видов сосальщиков, паразитирующих в печени сельскохозяйственных животных, живущих в зоне умеренного климата. Это вызвано тем, что пораженным органом мигрирует очень долго даже половозрелый сосальщик, питающийся преимущественно кровью хозяина. С широкой деструкцией связаны затем сравнительно серьезные изменения сосудистой системы пораженного органа. Пигмент, почти всегда встречающийся при инвазии этого сосальщика, относится к гематинам и содержит железо. Описанные патологические изменения в своем комплексе настолько типичны для этой инвазии, что этиологический диагноз возможно поставить уже при их определении даже в таком случае, когда сам паразит, может быть, еще и не был найден и установлен.

*Fascioloides magna* (Bassi, 1875); патогенность; звери и сельскохозяйственные животные

BLAŽEK K. (Parasitological Institute of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, Czechoslovakia). Disturbances in Liver and Some Other Organs Invaded by the Fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875). Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 369-374, 1969.

The pathogeneity of the fluke *Fascioloides magna* is much higher than that of other species of flukes — parasites in the liver of farm animals in the mild climatic zone. The reason is that it is also the sexually mature fluke feeding mostly on the blood of the host that migrates in the invaded organ for a long time. The large destruction, then, underlies bad changes in the blood-vessel system of the invaded organ. The pigment occurring almost in each case of invasion by this fluke belongs to hematin and contains masked iron. As a complex, the described pathological changes are so characteristic of this invasion that it is even in the cases of the parasite not being found and specified that the diagnosis can be made once the changes occur.

*Fascioloides magna* (Bassi, 1875); pathogeneity; game and farm animals

BLAŽEK K. (Parasitologisches Institut der ČSAV, Praha, Tschechoslowakei). Bechädigung der Leber und einiger anderen Organe bei Invasion des Leberegels *Fascioloides magna* (Bassi, 1875). Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 369-374, 1969.

Die Pathogenität des Leberegels *Fascioloides magna* ist wesentlich höher als die anderer Leberegelarten, welche in den Lebern der landwirtschaftlichen Haustiere der mäßigen Klimazone schmarotzen. Dies wird dadurch verursacht, daß durch das betroffene Organ sehr lange auch der vom Blut des Wirtes sich ernährende, ge-

schlechtsreife Leberegel migriert. Mit der ausgedehnten Destruktion hängen dann die verhältnismäßig schweren Veränderungen des Gefäßsystems des befallenen Organs zusammen. Das Pigment, welches fast immer bei der Invasion dieses Leberegels vorkommt, gehört zu den Hämatinen und enthält maskiertes Eisen. Die beschriebenen pathologischen Veränderungen sind im Komplex derart typisch für diese Invasion, daß man die ätiologische Diagnose bereits bei der Feststellung derselben auch bereits dann bestimmen kann, wenn der Erreger selbst eventuell nicht ermittelt und bestimmt wurde.

*Fascioloides magna* (Bassi, 1875); Pathogenität: Wild und landwirtschaftliche Haustiere

---

*Adresa autora:*

MVDr. Karel Blažek, CSc., ČSAV, Parasitologický ústav, Praha 6, Flemingovo nám. 2

---

# STABILITA CHROMATOGRAFICKÝCH VLASTNOSTÍ VIRU INFEKČNÍ HEPATITIDY PSŮ

G. Petr, E. Jiran

Bioveta, Terežín

---

PETR G., JIRAN E. *Stabilita chromatografických vlastností viru infekční hepatitidy psů*. Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 375-381, 1969.

Byla provedena chromatografie viru infekční hepatitidy psů (HCC) kmene označeného Staněk na sloupci Deae-Sephadexu A-50. Z pěti vrcholů infekivity na křivce bylo první a poslední maximum izolováno a pomnoženo. Postup byl opakován osmkrát. I po 8 pasážích zůstal tvar chromatografické křivky zachován. Bylo dále zjištěno, že stejný kmen viru HCC, pomnožovaný na třech různých substrátech (tkáňové kultury psích ledvinných buněk, ledvinných buněk selat, linie psích ledvinných buněk MDCK-USD), nemění své chromatografické vlastnosti.

stabilita chromatografického profilu viru infekční hepatitidy psů; vliv různých substrátů k pomnožení viru na tvar chromatografické křivky

---

V předchozí práci jsme zjistili (Petr, Jiran 1968), že různým kmenům viru infekční hepatitidy psů (HCC) odpovídají i různé křivky po chromatografii těchto kmenů na sloupci DEAE-Sephadexu. Současně s tím vznikla otázka, zda získaný chromatografický obraz zůstane stejný i při použití různých substrátů pro pomnožení viru a zda je možno u kmenů, které vykazují více vrcholů, jednotlivé vrcholy izolovat a dále pasážovat, aby tak bylo možno posléze získat populaci jednotné skladby s jediným vrcholem.

Čepulis a kol. (1967) při chromatografii viru klasického moru drůbeže poukázali na to, že infekční materiál, odebraný z libovolné frakce čtyř vrcholů, dává po pomnožení v kuřecích embryích stejný chromatografický profil jako běžný vzorek viru z allantoidní tekutiny kuřecích embryí. Na základě pokusů došli k závěru, že zjištěné rozdíly v chromatografickém profilu viru klasického moru drůbeže svědčí o heterogenitě výchozího infekčního materiálu, která je ovlivněna hostitelem, v němž se virus pomnožuje.

V předložené práci jsme přistoupili k řešení uvedené otázky u různých kmenů viru HCC.

## MATERIÁL A METODY

Tkáňové kultury. Používali jsme tkáňové kultury psích ledvinných buněk (TK PSL) a ledvinných epiteliálních buněk selat (TK SL), jejichž přípravu jsme uvedli již dříve (Jiran 1964, 1966). Dále jsme používali permanentní linie epiteliálních buněk psích ledvin označené MDCK — USD (dále jen USD), kterou nám laskavě poskytl dr. G a u s h z USA. Tuto linii jsme kultivovali

ve stejném růstovém prostředí jako primární TK PSL (tj. kompletní Earleho medium s přísadou 10 % telecího séra). Růstové vlastnosti linie USD byly stejné jako popisuje G a u s h a kol. (1966).

Infekční materiál. Používali jsme dva výchozí virové kmeny HCC, jak byly popsány již v předchozí práci (Petr, Jiran 1968), a to kmen STANĚK (S) a kmen CORNELL-I (C-I). Virový kmen S jsme kultivovali pouze na TK PSL, kmen C-I jednak z pasáží viru na TK PSL, jednak adaptovaný na TK SL (C-I/SL) a rovněž z pasáží na liniových buňkách USD (C-I/USD). V práci byl použit virus S ze 7. následné pasáže na TK PSL, virus C-I z 91. pasáže na TK PSL, z 21. postupné pasáže na TK SL a z 3. pasáže na linii USD.

Jako infekční materiál sloužilo vždy infekční medium z příslušných tkáňových kultur, odebrané na vrcholu specifických změn. Infekční materiál jsme ukládali jednak při  $-30^{\circ}\text{C}$ , jednak při  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Titrace viru. Vzorky z jednotlivých pokusů jsme testovali podobně, jak je uvedeno již v předchozích publikacích (Jiran 1964, Jiran 1966, Petr, Jiran 1968) v titracích na zkumavkových kulturách versenovaných TK PSL, kdy jsme na jedno ředění používali nejméně čtyři zkumavky. Po 6 až 7denní inkubaci jsme titrace vyhodnocovali podle cytopatického efektu a vypočítali TK ID<sub>50</sub> podle Reeda a Muencha (1938).

Chromatografie viru. Ke chromatografii viru byl používán DEAE-Sephadex A 50 firmy PHARMACIA (Uppsala, Švédsko), upravený 0,02 M fosfatovým pufrům o pH 7,4 do rovnováhy a sterilizovaný v suspenzi 30 minut při  $110^{\circ}\text{C}$ . Takto připravená sterilní suspenze byla použita k přípravě kolonek rozměrů 1 x 8 cm. Na kolonku byly nanášeny 4,0 ml infekčního materiálu, dialyzovaného předtím proti vyměňovanému 0,02 M fosfátu o pH 7,4. Adsorbovaný virus byl pak vymýván stoupajícími koncentracemi NaCl v 0,02 M fosfatovém pufru o pH 7,4, a to tak, že každá molarita NaCl představovala čtyři frakce po 4,0 ml. Jednotlivé frakce bez další úpravy byly titrovány na infektivitu současně s výchozím materiálem. Veškeré pracovní postupy byly prováděny sterilně při pokojové teplotě.

## VÝSLEDKY PRÁCE

### 1. POKUS O IZOLACI JEDNOTLIVÝCH VRCHOLŮ CHROMATOGRAFICKÉ KŘIVKY VIRU HCC

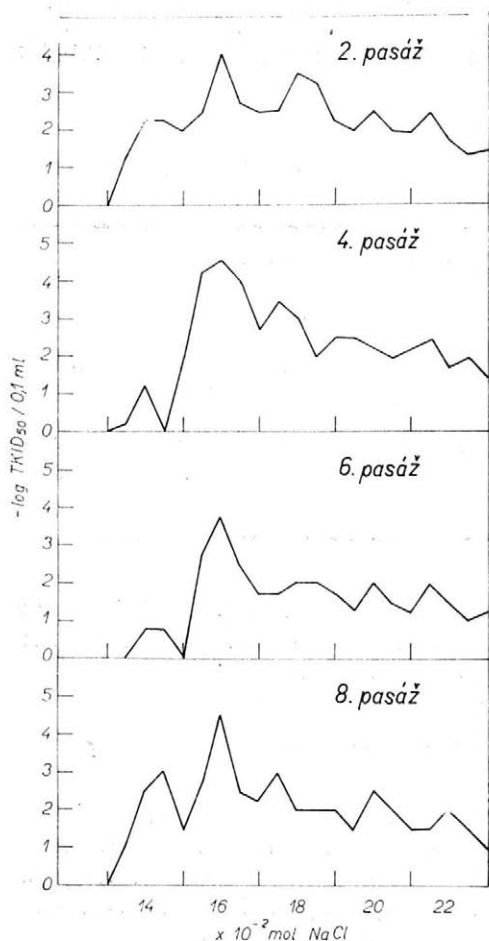
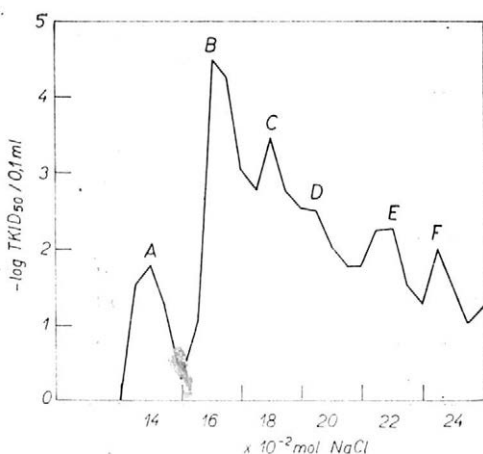
Na obr. 1 je uvedena chromatografická křivka viru HCC kmene S. Jednotlivé vrcholy na křivce, odpovídající jednotlivým molaritám NaCl, jsou označeny písmeny A—F. Vrchol A, odpovídající 0,14 M NaCl, byl pomnožen na TK PSL a získaný infekční materiál označený jako 1. pasáž frakce A byl znovu podroben chromatografii. I v tomto případě byla frakce odpovídající 0,14 M NaCl použita pro další pasáž na TK PSL a pomnožený virus, označený jako 2. pasáž frakce A, byl opět chromatografován. Tento postup byl opakován až do 8. pasáže. Sestavené chromatografické křivky některých pasáží jsou uvedeny na obr. 2.

V porovnání se základní křivkou na grafu je patrné, že charakteristický tvar křivky se v průběhu izolace a pasážování prvního vrcholu v podstatě nemění a že vždy vrchol B zůstává stabilně nejvyšší.

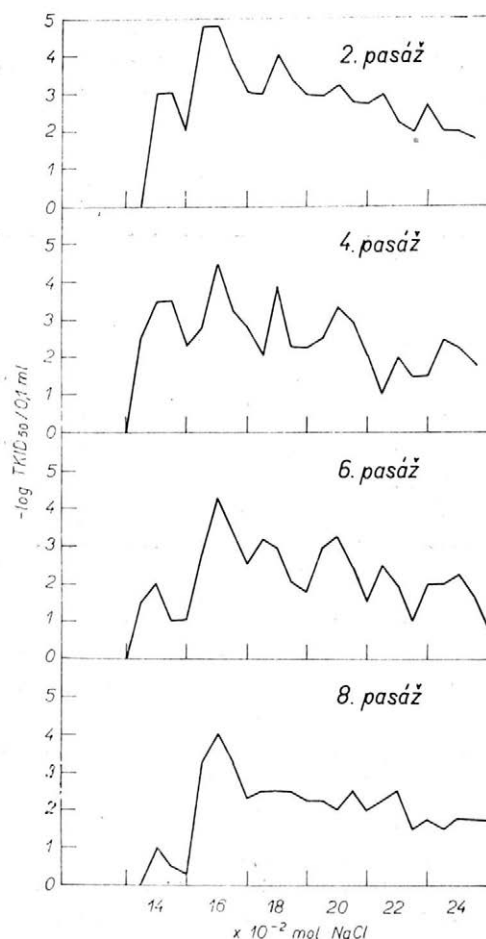
1. Chromatografická křivka viru HCC kmene STANĚK na DEAE-Sephadexu A-50

Podrobnější rozbor této série pokusů je uveden v tab. I, kde je infektivita jednotlivých vrcholů vyjádřena jako procento infekтивности vrcholu B. Pro porovnání jsou v tabulce rovněž uvedena procenta infekтивности jednotlivých vrcholů ze základní chromatografické křivky uvedené na obr. 1.

Vrchol F z frakcí eluovaných 0,24 M NaCl byl podroben stejnému postupu jako v případě vrcholu A. Frakce A



2. Opakovaná izolace a propagace vrcholu A z obr. 1



3. Opakovaná izolace a propagace vrcholu F z obr. 1

1. Procenta infekitivity jednotlivých vrcholů křivek z obr. 2 v porovnání s infektitou vrcholů křivky základní

|                 | % infekitivity ve vrcholu |     |      |   |     |     |
|-----------------|---------------------------|-----|------|---|-----|-----|
|                 | A                         | B   | C    | D | E   | F   |
| Základní křivka | 0,2                       | 100 | 10,0 | 1 | 0,6 | 0,3 |
| 2. pasáž        | 1,7                       | 100 | 31,0 | 3 | 3,0 | —   |
| 4. pasáž        | 0,1                       | 100 | 10,0 | 1 | 1,0 | —   |
| 6. pasáž        | 0,1                       | 100 | 2,0  | 2 | 2,0 | —   |
| 8. pasáž        | 3,1                       | 100 | 3,1  | 1 | 0,3 | —   |

a frakce F byly voleny v těchto pokusech proto, že jsou v chromatografické křivce od sebe nejvíce vzdáleny a vliv izolace s následným pasážováním na TK PSL by se měl nejvýrazněji projevit. Avšak i zde, jak je vidět z obr. 3, se chromatografické křivky jednotlivých pasáží vrcholu F vzájemně téměř neliší. Číselné vyjádření křivek z obr. 3 je uvedeno v tab. II, opět s hodnotami základní chromatografické křivky kmene S.

II. Procenta infekitivity jednotlivých vrcholů křivek z obr. 3 v porovnání s infektitou vrcholů křivky základní

|                 | % infekitivity ve vrcholu |     |    |    |      |     |
|-----------------|---------------------------|-----|----|----|------|-----|
|                 | A                         | B   | C  | D  | E    | F   |
| Základní křivka | 0,2                       | 100 | 10 | 1  | 0,6  | 0,3 |
| 2. pasáž        | 1,8                       | 100 | 18 | 10 | 10,0 | 3,0 |
| 4. pasáž        | 10,0                      | 100 | 10 | 5  | 0,3  | 1,0 |
| 6. pasáž        | 0,6                       | 100 | 10 | 10 | 2,5  | 1,0 |
| 8. pasáž        | 0,02                      | 100 | 3  | 3  | 3,0  | 0,6 |

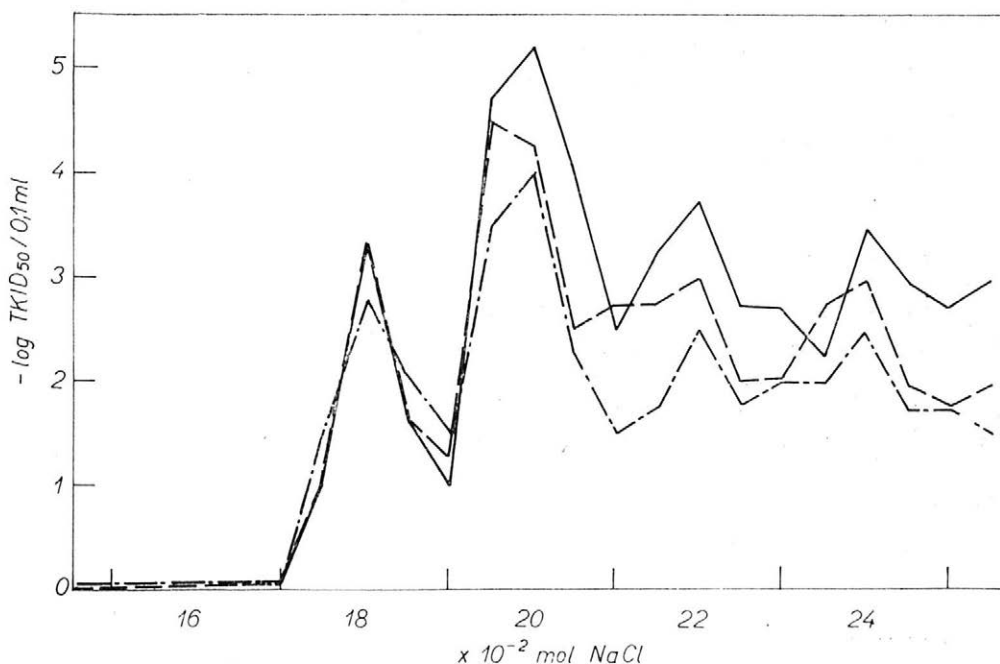
Z uvedených výsledků je zřejmé, že není možné izolovat jednotlivé vrcholy z chromatografické křivky viru HCC tak, aby se při dalším pomnožení viru jevil získaný materiál při chromatografii jako homogenní.

## 2. VLIV SUBSTRÁTU PRO POMNOŽENÍ VIRU HCC NA TVAR CHROMATOGRAFICKÝCH KŘIVEK

Při chromatografických studiích různých kmenů viru HCC (Petr, Jirán 1968) se ukázalo, že kmen C-I, pomnožovaný na TK PSL, má poněkud jiný chromatografický profil než tentýž kmen adaptovaný a pomnožovaný na TK SL. Chtěli jsme ověřit, zda tento rozdíl, i když nepatrný, je bezvýznamný, nebo zda je důsledkem odlišného substrátu při pomnožování viru.

Za tímto účelem byl kmen C-I pomnožen jednak na TK PSL, jednak na TK SL a na buněčných kulturách linie psích ledvinných buněk USD. Infekční

materiál všech tří typů stejného kmene (C-I, C-I/SL, C-I/USD), lišící se tedy pouze substrátem, na kterém byl pomnožován, byl pak chromatografován na třech kolonkách DEAE-Sehadexu současně a za stejných podmínek. Pokus byl dělán celkem pětkrát. Goemetrických průměrů výsledků všech pěti pokusů u všech tří typů infekčních materiálů pak bylo použito k sestavení chromatografických křivek. Ukázalo se, že tyto křivky, znázorněné na obr. 4, mají zhruba



#### 4. Chromatografická křivka viru HCC kmene CORNELL-I na DEAE-Sephadexu A-50

- pasážováno na tkáňových kulturách ledvinných buněk psích (TK PSL)
- pasážováno na tkáňových kulturách ledvinných buněk selat (TK SL)
- - - - - pasážováno na linii ledvinných buněk psích (MDCK - USD)

stejný charakter. U všech tří typů dochází k počátku eluce viru při 0,18 M NaCl a dosahuje maxima při 0,20 M NaCl. Na základě toho lze mít za to, že v daném případě substrát, na kterém byl virus pomnožován, neovlivnil průběh eluce viru, ani nezpůsobil nějakou jinou změnu chromatografického profilu.

## DISKUSE

Výskyt několika vrcholů infekitivity na chromatografické křivce předpokládá heterogenitu dané populace, přičemž příčinou heterogenity může být přítomnost jiného kmene nebo typu daného viru. Pokud obě složky mají samy o sobě různé chromatografické chování, je možno opakovanou izolací jednotlivých maxim infekitivity získat obě složky opět čisté. Tohoto způsobu například použil Haas a kol. (1961) při dělení směsi dvou kmenů viru ECHO 9.

Pokud však chromatografická křivka čistého kmene nebo typu daného viru vykazuje více maxim infekitivity, pak se naskytá otázka opakované izolace jed-

notlivých maxim následným pomnožením. Jak však výsledky pokusů ukázaly, neměla ani osmkrát opakovaná izolace sledovaného maxima vliv na změnu tvaru chromatografické křivky. To předpokládá, že výskyt jednotlivých vrcholů na křivce spočívá v propagaci samotné, ať je použito populace z kteréhokoliv maxima infekitivity. Proto také vrchol F po osminásobné izolaci dal stejný výsledek jako osmkrát izolovaný a pomnožený vrchol A.

Čepulis a kol. (1967) na základě pokusů s virem klasického moru drůbeže došli k přesvědčení, že tvar chromatografické křivky je dán substrátem, na kterém byl virus pomnožován, protože virus, pomnožený v allantoidní tekutině kuřecích embryí, se v chromatografickém chování lišil od stejného viru pomnožovaného na tkáňových kulturách.

V další části pokusů, kdy jsme použili tři různých substrátů pro pomnožování viru HCC, však k žádné změně chromatografického chování nedošlo. V našem případě tedy neměl substrát na utváření křivky vliv.

Na druhé straně při práci s virem slintavky a kulhavky typu C však bylo zjištěno, že virus, pomnožovaný na tkáňových kulturách telecích ledvinných epiteliálních buněk v primární kultivaci, je ze sloupce DEAE-celulózy eluován při 0,02 M NaCl, zatímco stejný virus adaptovaný na liniové buňky prasečích ledvin PK-C je vymýván při 0,09 M NaCl.

V našich pokusech s virem HCC, kmenem C-I, zřejmě nedošlo během adaptace na uvedené substráty k signifikatnímu ovlivnění chromatografického chování tohoto viru. Dále je rovněž možné, že rozhodujícím faktorem zde mohl být, zejména při adaptaci na linii buněk psích ledvin USD, i nízký počet pasáží.

Technická spolupráce Jana Kubíková

## Literatura

- ЧЕПУЛИС Г. К. С., БОЧАРОВ А. Ф., ЖДАНОВ В. М., 1967, Инообменная хроматография вируса классической чумы птиц на целлюлозных обмениках. Вопросы вирусол. 4 : 439-445.
- GAUSH Ch. R., HARD W. L., SMITH T. F., 1966, Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). PSEBaM 122 : 931-935.
- HAAS R., THOMSEN R., MAAS G., GIESELER A., 1961, Über die Verwendung von Aluminium-Hydroxyd zur Reinigung und Differenzierung von Enteroviren. Zeitschr. f. Hygiene 148 : 2-13.
- JIRAN E., 1964, Infekční zánět jater psů (Rubarth). Izolace a kultivace viru. Vet. Med. (Praha) 9 : 267-272.
- JIRAN E., 1966, K atenuaci viru infekční hepatitidy psů. Vet. Med. (Praha) 11 : 215-223.
- PETR G., JIRAN E., 1968, Diferenciace různých kmenů viru infekční hepatitidy psů. Vet. Med. (Praha) 13 (8-9) : 501-510.
- REED L. J., MUENCH H., 1938, A simple method of estimating fifty per cent endpoint. Am. J. Hyg. 27 : 493-497.

Došlo dne 26. 8. 1968

---

ПЕТР Г., ЙИРАН Е. (Биовета, Терезин, Чехословакия). Стойкость хроматографических свойств вирусов инфекционного гепатита собак. Вет. мед. (Прага) 14 (6) : 375-381, 1969.

Была проведена хроматография вируса НСС штамма, обозначенного СТАНЕК на столбце ДЕАЕ-Сефадекса А-50. Из пяти вершин кривой развития инфекции, первый и последний максимум были изолированы и размножены с восьмикратной повторностью. Даже после восьми пассажей форма хроматографической кривой сохранилась. Далее было установлено,

что тот же штамм вируса HCC, размножившийся на трех разных субстратах (тканевые культуры собачьих почечных клеток, почечных клеток поросят, линии собачьих почечных клеток MDCK-USD) не меняли своих хроматографических свойств.

стойкость хроматографического профиля вирусов инфекции гепатита собак; влияние разных субстратов для размножения вируса на форму хроматографической кривой

PETR G., JIRAN E. (Bioveta, Terezín, Czechoslovakia). *The Stability of the Chromatographic Properties of the Virus of Infectious Hepatitis in Dogs* Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 375-381, 1969.

A chromatographic examination of the HCC virus denoted as STANĚK was carried out on the DEAE Sephadex A-50 column. Of the five infectivity peaks on the curve the first and the last maxima were isolated and multiplied. The procedure was repeated eight times. Not even the eight passage could change the shape of the chromatographic curve. Furthermore, it was found that the same strain of the HCC virus, multiplied in three different substrates (the tissue cultures of the dog kidney cells, of the piglet kidney cells, the MDCK-USD line of dog kidney) does not change in its chromatographic properties.

the stability of the dog infectious hepatitis virus chromatography; the effect of various virus multiplication substrates on the shape of the chromatographic curve

PETR G., JIRAN E. (Bioveta, Terezín, Tschechoslowakei). *Die Stabilität chromatographischer Eigenschaften des Virus der infektiösen Hepatitis der Hunde*. Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 375-381, 1969.

Die Chromatographie des Virus HCC des mit STANĚK bezeichneten Stammes an der Säule des DEAE-Sephadexes A-50 wurde durchgeführt. Von fünf Infektivitätsscheiteln der Kurve wurde das erste und letzte Maximum isoliert und vermehrt. Der Vorgang wurde achtmal wiederholt. Auch nach acht Passagen blieb die Form der chromatographischen Kurve erhalten. Ferner konnte festgestellt werden, daß derselbe Stamm des Virus HCC, der auf drei verschiedenen Substraten vermehrt worden war (Gewebekulturen der Hundenierenzellen, Ferkelnierenzellen, Linien der Hundenierenzellen MDCK-USD), seine chromatographischen Eigenschaften nicht verändert.

Stabilität des chromatographischen Profils des Virus der infektiösen Hepatitis bei Hunden; Einfluß verschiedener Substrate für die Vermehrung des Virus auf die Form der chromatographischen Kurve

---

Adresa autorů:

RNDr. Gustav Petr, MVDr. Eduard Jiran, CSc., Bioveta, Terezín

---

## MALE INFORMACE

### ● Zpráva o vypuknutí virového průjmu ve stádě mléčného skotu

Jde o onemocnění, které je málo charakteristické, a proto se vyskytuje patrně častěji, než je diagnostikováno. Při nízké mortalitě má vysokou morbiditu, a proto se ztráty ekonomicky projevují zejména poklesem užitkovosti. Inkubační doba v terénních podmínkách je 1 až 3 týdny. Hlavním příznakem onemocnění je průjem. Ve 3. až 6. týdnu po vzniku onemocnění dochází k obrátům. K zamezení komplikací se použije terapie antibiotiky.

(Podle Modern Veterinary Practice, r. 1967, č. 11. Zprac. Dr. Stanislav Mudra)

## SOUČASNÝ STAV A ZKUŠENOSTI S UMĚLÝM OSEMEŇOVÁNÍM PRASAT

J. Kozumplík

VSZ, veterinární fakulta, katedra porodnicko-gynekologická, Brno

KOZUMPLÍK J. *Současný stav a zkušenosti s umělým osemeňováním prasat.* Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 383-392, 1969.

V práci jsou podány vlastní zkušenosti s odběrem ejakulátu kanců, posuzováním kvality semene, technikou inseminace prasnic a konečně jsou uvedeny výsledky inseminace prasnic. Srovnáváním s výsledky našich i zahraničních autorů byl získán ucelený přehled o současné problematice umělého osemeňování prasat. Po první inseminaci bylo dosaženo 76,1 % březosti v tzv. laboratorních podmínkách a 62,1 % březosti v terénu.

odběr semene kance; hodnocení kvality ejakulátu; technika umělého osemeňování; výsledky inseminace prasnic

I když první pokusy s umělým osemeňováním prasat započaly v třicátých letech (Rodin a kol. 1931), uplatnila se tato metoda ve větší míře teprve po druhé světové válce. V současné době se v některých zemích inseminuje již 20 až 30 % chovaných prasnic (Japonsko, Holandsko, Finsko aj.), v jiných zemích (SSSR, Jugoslávie, Maďarsko aj.) se na základě dobrých zkušeností s touto metodou přikládá umělému osemeňování prasnic též význam jako umělému osemeňování skotu. Proto je možno pozorovat, že každým rokem nejen přibývá počet inseminovaných prasnic, ale roste i počet států, v nichž odborníci v živočišné výrobě pochopili, že rychlejší zvýšení živočišné výroby a užítkovosti chovu je spojeno jen se zavedením této metody.

Vzhledem k tomu, že také v ČSSR je o tuto metodu velký zájem a jsou i podmínky (především ve velkochovech, soustředěných kolem státních statků) pro plné rozvinutí a náležité uplatnění umělého osemeňování prasnic, je úkolem práce podat přehled nejen o výsledcích dosažených na našem pracovišti, ale i na pracovištích zahraničních.

### Organizační formy

V Japonsku (Riddell-Swan 1960) jsou zřízena střediska, kde se chovají plemenní kanci a odkud je ejakulát rozeslán buďto do poboček, nebo přímo k použití na farmy. Do procesu inseminace jsou zapojeni veterinární lékaři, vlastní inseminaci provádějí převážně technici. V Norsku jsou inseminační střediska a inseminace je řízena a vykonávána veterinárními lékaři. V Maďarsku realizují inseminaci technici; školení techniků a dozor nad inseminační službou vykonávají převážně veterinární lékaři. V Anglii jsou střediska pro inseminaci prasat přidružena k inseminačním střediskům pro skot a umělé osemeňování uskutečňují stejní pracovníci jak u skotu, tak u prasat (Roth 1964). V SSSR jsou zřízena samostatná inseminační střediska pro chov prasat. Částečně jsou tato střediska také při stanicích pro inseminaci hospodářských zvířat, popř. jsou na velkých kolchozech či sovchozech. Inseminace konají k tomu účelu speciálně školení technici. Školení techniků organizují jak vysoké školy zemědělské, tak Moskevská

veterinární akademie (Kvasnickij a kol. 1962). V Jugoslávii existují dvě organizační formy. V jednom případě jsou střediska spojena s umělou inseminací skotu a odtud je semeno na požádání rozváženo na farmy, popříp. na veterinární střediska. Veterinární lékaři, v menší míře technici, inseminují prasnice na jednotlivých farmách. V druhém případě jsou plemenní kanci soustředěni při velké farmě (nejméně 500 prasnic) a získané sperma se používá k osemenování prasnic jen uvnitř farmy (Šimunich 1967).

V ČSSR se uvažuje o tom, že inseminační střediska budou vybudována na velkých farmách nebo v jejich blízkosti, takže nebude nutno semeno převážet na velké vzdálenosti.

### Využití plemeníků

Aby mohli být plemenní kanci správně využíváni, je nutno věnovat náležitou pozornost jak strance krmení a ošetřování, tak i frekvenci odběru semene.

Vzhledem k tomu, že při zavádění umělého osemenování se počítá s celoročním využíváním plemeníků, neměl by mít způsob krmení a ošetřování sezónní charakter. Usuzuje se, že plemeníci by měli dostávat přibližně stejné krmné dávky jako kojící prasnice. I když krajní názory na obsah stravitelných bílkovin se někdy rozcházejí, většina autorů se shoduje na tom, že krmná dávka vzhledem ke stáří kance by jich měla obsahovat 350 až 700 g (Kvasnickij a kol. 1962, Kábrt 1959, Redkin 1954 aj.).

Tak jako pro jiné plemeníky, i pro kance je nutný denní pohyb, resp. provádění. Délka provádění je závislá na počasí (od 30 min. do 2 hodin). V letních měsících je lepší ustájit kance ve výběžích. Plemenné kance je nutno pravidelně čistit a v teplém počasí koupat nebo mýt. Nesmí se opomíjet ani ošetření špárků.

Frekvenci odběru ejakulátu je nutno stanovit tak (vzhledem ke stáří plemeníka), aby se jeho kvalita nezhoršovala a pohlavní pud kance neochaboval. Proto se doporučuje získávat ejakulát od kanců do stáří jednoho roku jednou za týden nebo s čtyřdenními přestávkami (Radford 1961). U starších plemeníků je nutno odběr ejakulátu přizpůsobovat schopnostem jednotlivých jedinců. V každém případě je však prokázáno, že denní odběr semene má nepříznivý vliv na životnost i koncentraci spermií (Turkheimer a kol. 1958, Kozumplik 1964 a.). Nejčastěji se doporučuje, aby přestávka mezi jednotlivými odběry byla dva až tři dny (Aamdal a Högset 1957, Hansen a Jakobsen 1958, Milova-

nov 1957, Ožim 1959, Niwa a kol. 1959, Smidt 1961 aj.). Dochází-li k odběru jednou za jeden a půl až dva dny, je nutno kancům dopřát oddechu po každých 12 až 13 dnech. Úřady autorů, kteří se zabírali otázkou vlivu frekvence získávání ejakulátu na kvalitu semene, převládá názor, že za normálních podmínek lze od kance odebírat semeno dvakrát až třikrát týdně.

### Metody získávání semene

K získání ejakulátu se ponejvíce doporučuje používat umělé pochvy, i když v poslední době je např. v Jugoslávii značně rozšířen způsob odběru semene do sběrače po prostém zachycení pyje rukou, bez použití umělé pochvy. V ojedinělých případech se doporučuje i elektroejakulace.

Metodu elektroejakulace propracoval především Dziuk a kol. (1954). K dráždění používal bipolární elektrodu tvaru tyče o průměru 2,8 cm, na které bylo 7 kruhových elektrod vzdálených od sebe 3,8 cm. Před zavedením elektrody vypláchl rectum 3,5% roztokem kuchyňské soli. Elektrodu zasunoval do recta tak daleko, až byl v konečníku i poslední kruh. K dráždění používal proudy o napětí 10 až 15 V a intenzitě 0,5 až 1 A. Impulsy trvaly pět vteřin a stejně dlouho trvala přestávka. K vyvolání ejakulace potřeboval průměrně 10 impulsů. Výsledky však byly velmi různorodé a kvalita ejakulátu se od sebe výrazně lišila. Nepodařilo se získat více než 1 až 8 ml ejakulátu, v němž chyběl sekret přídatných pohlavních žláz. Elektroejakulaci prováděl na spoutaných kancích.

Podstatně lepších výsledků dosáhla Vera Cruz (1959). Grove a Tiefenbach (1961) upozorňují na prudké obranné reflexy kanců; proto aplikovali před vlastním zákrokem nejdříve barbituráty. Výsledky však byly značně rozdílné, a proto elektroejakulaci doporučují pouze u kanců, kteří odmítají nebo nemohou vzeskočit na fantom. Uvedenou metodu doporučují k dosažení prolapsu pyje za účelem diagnostickým a terapeutickým. Rovněž Spranck (1962), který odebíral ejakulát u 50 kanců, uvádí, že tato metoda má částečný význam pouze pro jednotlivé případy sterility. Také naše výsledky, dosažené u 13 plemenných kanců, se shodují se závěry Sprancka (1962), neboť ejakulát se v žádném případě nemohl rovnávat s kvalitou semene po odběru pomocí umělé pochvy (Dumnon 1965).

Z uvedeného přehledu jasně vyplývá, že k získání kvalitního ejakulátu od kan-

ce se mnohem lépe osvědčuje umělá pochva. V principu se jedná o umělou pochvu, běžně používanou k odběru semene býka, zpravidla zkrácenou na 20 až 25 cm, která se vkládá do fantómu, nebo se (řídčeji) získává sperma pomocí umělé pochvy po vzeskoku kance na říjící se prasnici. Baier a Grauvogel (1959) odebírají semeno i na kanci fixovaném nosní smyčkou. Vzhledem k tomu, že dlouhé trvání páření prasat a neklid partnera ztěžuje práci, používá se ve většině případů k odběru semene fantómů. I když po návyku není zcela nutné, aby fantóm odpovídal tvaru prasnice, přesto je možno pozorovat, že odběr ejakulátu, hlavně při prvních pokusech, je urychlen, použije-li se fantómu odpovídajícího obrysům prasnice a je-li kryt kůží se štětinami. Podobné zkušenosti získal i Rothe (1964), Pásztor (1955), Bonadonna (1957), Hahn (1958) aj. Rozměry jsou udávány v následujících průměrech: délka 90 až 120 cm, výška 60 cm a šířka 30 cm. Doporučuje se také, aby výška, hlavně u stabilně zabudovaných fantómů, mohla být vzhledem k velikosti kance měněna mechanickým zařízením.

Umělá pochva se zahřívá na 40 až 42 °C. V některých případech doporučují autoři i elektrické vyhřívání umělé pochvy, které zajišťuje po celý odběr stejnou teplotu (Kvasnický a kol. 1962, Podaný a kol. 1964 a 1966). Podle našich zkušeností však teplota umělé pochvy nemá rozhodující vliv na vybavení reflexu ejakulace (Vyhnaněk 1962).

Část autorů doporučuje přizpůsobit umělou pochvu přirozeným podmínkám tím, že v průběhu ejakulace zvyšují a snižují tlak v pochvě (50 cm vodního sloupce a nižší) (Hofmann 1959), jiní autoři vkládají do pochvy spirálový prstenec, který má imitovat krček děložní (Melroze a O'Hagan 1959). Velká část autorů doporučuje jednoduchý zkrácený model umělé pochvy, který je spojen gumovou spojkou (20 až 30 cm dlouhou) se sběračem semene. V průběhu ejakulace je pak pyj zachycen přes gumovou spojku rukou, čímž se má napodobit fixace pyje v krčku děložním. Tento princip je nejvíce zdůrazněn u umělé pochvy popisované McKenzie (1931) a Item a kol. (1948a). V podstatě se jedná jen o gumovou hadici s bambusovým kroužkem na jejím začátku, který udržuje kruhový tvar. Jak již bylo uvedeno, používá se v terénní praxi v Jugoslávii ten způsob, že kanci se po vzeskoku na fantóm zachytí hrot errigovaného pyje rukou v rukavici a ejakulát se chytá do nádoby. Podobnou metodu popisuje i Wierzchosz (1968). Předností posled-

ně uvedeného způsobu je skutečnost, že pod kontrolou zraku lze snadno oddělit od sebe jednotlivé frakce ejakulátu.

Jako sběrače semene se používá nejčastěji skleněné nádoby o obsahu 500, až 700 ml. Stěna sběrače je u většiny typů jednoduchá a pouze v chladnějším období je chráněna obalem, nebo je prostor ve fantómu vyhříván elektricky.

## Průběh ejakulace

Obvykle lze uskutečnit odběr semene od kance na fantómu bez větších obtíží. Mnohem snáze je tomu u kanců starších, zatímco při odběru od mladých plemenů je třeba větší trpělivosti (Williams 1959). Podle našich zkušeností odmítlo vzskočit na fantóm asi 10 % kanců, z toho převážně mladých.

Při prvních pokusech nebo použití nových fantómů je výhodné, potře-li se zád fantómu močí říjící se prasnice. Osvědčil se i způsob odběru semene v místě, kde kanec již několikrát přirozeně prasnice kryl.

Jakmile kanec po vzeskoku na fantóm přestane vykonávat třecí pohyby, dochází k ejakulaci. Počátek ejakulace je zevně patrný stažením varlat a rytmickým stahováním svalstva v anální krajině. Sperma je ejakulováno ve třech frakcích.

První frakce (předspermová) začíná v okamžiku, kdy kanec provádí vyhledávací pohyby. Zpravidla bývá v důsledku příměsí moče nažloutlá a je tvořena sekrety uretrálních žláz a v malém množství i sekrety Cowperových žláz.

Druhá frakce (spermatická) je bohatá na spermie a souvisí s uklidněním kance. V této fázi se vylučuje ve více vlnách hlavní část spermií, smíšená se světlým vodnatým sekretem předstojné žlázy, mléčně bílým sekretem semenných váčků a částečně také se sekretem bulbouretrálních žláz.

Třetí frakce (pospermová) je relativně chudá na spermie a obsahuje částečně chuchvalce podobné tapikové dřevě. Počází převážně z Cowperových žláz. Za přirozeného páření se tento gel hromadí v pochvě, kde vytváří kompaktní masu kuželovitého tvaru, která uzavírá pochvu.

Uvedené tři frakce tvoří ejakulační vlnu. Podle toho, zda ejakulace probíhá v jedné nebo více vlnách, rozeznává Ito a kol. (1948b) pět různých druhů ejakulace. Je to jedno až čtyřvlnný typ a konečně typ nepravidelný, kdy frakce nejdou v uvedeném pořadí. U kanců přichází nejčastěji v úvahu jedno nebo dvouvlnný typ ejakulace. Časové rozmezí mezi počátkem a koncem ejakulace je tedy závislé na typu ejakulace, která je do velké

míry podmíněna i frekvencí připouštění nebo odběrem ejakulátu. Za normálních okolností se nejčastěji uvádí hodnoty 5 až 7 minut (Grauvogl 1961, Lagerlöf a Carlquist 1961, Ožin 1959, Podaný a kol. 1966 aj.). Rovněž objem ejakulovaného semene je do velké míry závislý na frekvenci odběru ejakulátu (Turkheimer a kol. 1958), i když je ovlivňován individualitou pleménika, dále stářím, výživou, způsobem chovu apod. Nejčastěji se uvádí v hranicích od 50 do 500 ml.

### Posouzení ejakulátu

Při hodnocení ejakulátu kance se dodržují stejné zásady, jaké jsou stanoveny pro vyšetření spermatu býka (teplota laboratoře, skla a pomůcek, které přicházejí do styku s vyšetřovaným semenem apod.).

Po odběru semene se oddělí od tekuté části ejakulátu hlen přes filtrační gázu (není-li filtrace prováděna již během odběru), stanoví se pH a sperma se posoudí makroskopicky a mikroskopicky.

Sperma znečištěné, s hnílobným zápachem, s přímíseninami krve, hnisu nebo moči se ke konzervaci a umělé inseminaci nepoužívá.

Objem ejakulátu se zjišťuje zpravidla s přesností 1 ml, nejlépe v graduované nádobě. Konsistence ejakulátu kance je ve většině případů vodnatá a jen u velmi hustých ejakulátů nebo ve frakci bohaté na spermie lze zjistit zrnitost.

Základní barva ejakulátu je mléčné bílá. Odchytky od této barvy, vyjádřené různými odstíny, jsou podmíněny u normálního ejakulátu koncentrací spermií.

Pach semene kance je nevýrazný a jen v případech, kdy došlo k vytlačení obsahu preputiálního vaku do umělé pochvy, je typicky kančí.

Krajní hodnoty pH semene kolísají od 6,8 do 7,9 (Götze 1949, Polge 1956, Foote a kol. 1959, Rob 1960, Kozumplík 1966, Podaný a kol. 1966 aj.).

Mikroskopické vyšetření ejakulátu kance spočívá v posouzení pohyblivosti, koncentrace a morfologie spermií. Podobně jako u býka, i u kance má dobré sperma obsahovat asi 70 % progresivně se pohybujících spermií (Hofmann 1959). Podle Kvasnického a kol. (1962) je možno k inseminaci použít ejakulátu, v němž je zjištěn minimálně u 50 % spermií progresivní pohyb. Metodika posuzování motility spermií je shodná s metodikou používanou u býků. Nelze však, nebo jen výjimečně u velmi hustých ejakulátů, zjistit vlnový pohyb spermií. I když je možno určit přibližnou hustotu spermií mikroskopicky, k přesnějšímu

stanovení počtu spermií je nutno použít haemocytometru, protože hranice mezi hustým a řídkým ejakulátem jsou relativně nízké.

Za husté sperma se označuje takové, kde v 1 mm<sup>3</sup> je více než 210 000 spermií. Středně hustý ejakulát obsahuje 110 000 až 200 000 a řídký ejakulát má méně než 100 000 spermií v 1 mm<sup>3</sup> (Kvasnickij a kol. 1962). S menšími odchylkami navrhuje hodnotit kvalitu ejakulátu Podaný a Muzikant (1967).

K umělé inseminaci lze použít i semeno řídké. Neobsahuje-li však ani 50 000 spermií v 1 mm<sup>3</sup>, je (podle našich zkušeností) jeho fertilita pochybná.

Hodnocení koncentrace a pohyblivosti spermií však nestačí k posouzení kvality semene. Proto řada autorů doporučuje ještě morfologické vyšetření spermií, v menší míře zkoušku rezistence, přežitelnosti a dehydrogenační zkoušku.

Morfologické vyšetření probíhá podle stejných zásad jako u spermií býka. Někteří autoři jsou toho mínění, že v ejakulátu normálně plodného kance se vyskytuje maximálně 20 % morfologicky změněných spermií (Smith 1961, Mašek 1960, Rob 1960, 1963 aj.), nebo že ejakulát s více než 25 % abnormálních forem spermií je pochybné kvality (Hancock 1957, Herrick 1949, Kozumplík 1966). Na změnách spermií se podílí až 10 % protoplazmatická kapka (Bane 1959, Bonadonna, Curto 1960, Holst 1949 aj.).

Zkouška rezistence je v různých obměnách doporučována řadou autorů, právě tak i zkouška odbarvovací. Podle našich zkušeností však obě zkoušky nejsou zcela spolehlivé, neboť hodnoty určené pro spermie plodných kanců se nelišily od hodnot zjištěných u pleménků se sníženou plodností nebo u kanců neplodných (Kozumplík 1964).

### Ředění a konzervace ejakulátu

Použití jednotlivých ředidel závisí vždy na způsobu a délce konzervace. Pro určité konzervační teploty a doby nejsou všechna ředidla stejně vhodná.

Vzhledem k objemu a ceně použitých ředidel se pro krátkodobou konzervaci používá nejčastěji solných a cukerných roztoků. Nejčastěji se doporučuje 0,7% roztok NaCl, 5 až 6 % glukózy a 10 % sacharózy (Ito a kol. 1948), nebo roztok glukózo-sodný, glukóza 3,0, NaCl 0,45, dest. voda 100,0 (Kvasnickij a kol. 1962). V Jugoslávii se ve velké míře používá ředidla o složení glukóza 20,0, natr. citrát 10,0, natr. acetat 20,0, dest. voda 1000,0.

Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo

také s ředidly obsahujícími 2 až 3 % glycerinu a 30 % žloutku (Polge 1956, Madden 1959 a 1961). Holt (1959) však zaznamenal lepší výsledky s citrátovými ředidly.

Poměrně často jsou používána ředidla s 30 % citrátem sodným a s 25 až 30 % žloutku (Bane 1959, Paredis 1959, Amdal 1960). Polge (1956) však nepřipisuje citrátovému ředidlu dobré vlastnosti, podobně jako jiní autoři (Amdal, Högset 1957) ředidlu fosfátovému.

Jako ředidlo se však také dobře osvědčilo pasterované odstředěné mléko s přídavkem žloutku, nebo samotné čerstvé kravské mléko zahřáté 10 minut ve vodní lázni při teplotě 92 °C (Kvasnickij a kol. 1962 aj.). Z dalších autorů, kteří používají k ředění semene kance převarené a různým způsobem upravené mléko, je nutno ještě jmenovat Rodina (1960), Jakobsena (1959), Stratmana, Selfa a Smitha (1958) aj. Řada autorů používá ještě kombinovaná ředidla, jako sušené odstředěné mléko (8 %), glukóza (6 %) a sulfonamidy (Niwa a kol. 1959), nebo glukóza, *natrium bicarbonicum*, odstředěné mléko a antibiotika (Du Mesnil Du Buisson a Dauzier 1958). Dziuk (1958) doporučuje používat ředidlo složené z glukózy (3 g), *natr. bicarbonica* (0,15 g), žloutku (30 ml) a dest. vody (70 ml) atd.

Jako látky tlumící růst zárodků se nejčastěji doporučují krystalický penicilin v dávce 500 až 1000 m. j. a streptomycin 0,5 až 1 mg na 1 ml ředidla.

Poměr semene k ředidlu je udáván nejčastěji 1 : 6, avšak poměr ředění má vždy vycházet z koncentrace spermií v ejakulátu tak, aby v inseminační dávce bylo asi 5 miliard spermií.

Nejrozšířenější metoda konzervace ejakulátu kance je krátkodobé uchovávání při pokojové teplotě, tj. mezi 15 až 20 °C. Za tímto účelem je možno použít cukerných solných nebo citrátových ředidel (Ito a kol. 1948, Kvasnickij a kol. 1962, Jakobsen 1959 aj.). Výsledky v oplození se však zhoršují, nepoužije-li se naředěný a konzervovaný ejakulát ještě též den k inseminaci.

Řada autorů činila také pokusy s uchováváním ředěného spermatu při teplotě 0 až 5 °C. Jako ředidla pro tento způsob se nejčastěji doporučují ředidla mléčná, glycinová nebo glukózová s přídavkem žloutku.

Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo také s ředidlem nasyceným CO<sub>2</sub>. První pokusy v tomto směru dělal Du Mesnil Du Buisson a Dauzier (1958), kteří k tomu účelu použili ředidla navrženého Van Demarkem a Sharmou (1956).

Výsledky dosažené v laboratoři však neodpovídaly výsledkům v provozních podmínkách.

V neposlední řadě byly konány pokusy i s hlubokým zmrazením semene kance. Polge (1956) uvádí, že při klasickém, tj. pomalém způsobu zmrazování oživne po rozmrazení asi 25 % spermií. Podobný výsledek zaznamenal i Johari (1956), který dosáhl po inseminaci 25 prasnicek zmrazeným semenem 7 zabřeznutí. Jak uvádí Derivaux (1959), nedosáhl po inseminaci zmrazeným semenem úspěchu Polge (1956) a také Bane (1959). Na našem pracovišti děláme pokusy se zmrazováním semene pomocí kapkové metody a počet oživených spermií se pohybuje od 0 do 40 %. Podle našich zkušeností není ejakulát každého kance k zmrazování vhodný a nejlepší výsledky byly dosaženy při použití frakce bohaté na spermie. Pokusy s inseminací zmrazeným semenem však dosud činěny nebyly.

### Vhodná doba pro umělé osemeňování prasnic

Při inseminaci prasnic je stanovení říje a volba vhodné doby k osemenění činitelem, na němž závisí celý výsledek inseminace. Aby bylo možno tento okamžik vystihnout, je nutno pevně stanovit začátek svolnosti k páření. Objeví-li se dobře znatelné příznaky říje (zduření a zarudnutí vulvy), je nutno stanovit začátek svolnosti k páření. Proto se doporučuje ráno a večer přivádět k prasnicím s příznaky říje kance (Kvasnickij a kol. 1962). K správnému stanovení začátku vlastní říje je nutno prasnice zkoušet ještě v době, kdy kance nepřijímají. Jakmile však pohlavní vzrušení dosáhne optimální výše, projeví se u prasnice v přítomnosti kance reflex nehybnosti a prasnice neutíká. Tento okamžik je začátkem období svolnosti k páření. Nezaznamená-li se také období, kdy prasnice kance odmítá, není možno určit, kdy vlastně svolnost k páření nastala.

Nejspolehlivěji lze okamžik svolnosti zjistit individuálním zkoušením prasnic kancem (Kvasnickij a kol. 1962). Podobný způsob popisuje také Hancock (1959), Polge (1956), Milovanov (1957), König (1960), Podaný a kol. (1966) aj. Nejčastěji se doporučuje takový postup, že kanci se provádějí kolem ustájených prasnic a na základě chování prasnic se pak stadium svolnosti zjišťuje individuálně.

Asi u 50 % prasnic je možno reflex nehybnosti vyvolat tlakem na hřbet prasnice. Dále se doporučuje uchopit prasnici před zadními končetinami a pokusit se

ji zvednout, popříp. zatíží zkoušející technik prasnici tím, že na ni nalehne nebo se posadí rozkročno na její zád. Tyto metody zkoušení popisují Madden (1959, 1961), Aamdal, Högset (1957), Dziuk (1959), Rothe (1964), Podaný a kol. (1966) aj. Pro určování říje prasnice se však uvedená metoda mnoho neosvědčila. Poměrně dobré výsledky byly zaznamenány také tehdy, vysílal-li se při zkoušení prasnic hlas kance z magnetofonového pásku (Signoret a kol. 1960). V poslední době jsou konány pokusy, při nichž byly získány dobré zkušenosti se stanovením optimální doby k inseminaci pomocí měření elektrického odporu vaginální sliznice (Černe 1967).

Stanoví-li se tedy začátek svolnosti k páření, doporučuje většina autorů uměle osemenovat za 12 až 24 hodiny. Inseminuje-li se v průběhu říje jen jednou, uvádí se doba nejčastěji kolem 20 až 24 hodin od začátku doby, kdy byla zjištěna svolnost k páření a v případech reinseminace v průběhu jedné říje se doporučuje nejčastěji druhá inseminace v rozmezí od 8 do 16 hodin po první (Ožin 1959, Šimunič 1967, Rothe 1964, Podaný a kol. 1966) atd.

Pokud se týká vhodné doby pro inseminaci prvníček, doporučuje Kvasnickij a kol. (1962) kolem 30 hodin od začátku doby, kdy byl zjištěn reflex mehybnosti, zatímco Pitkjanen (1961) uvádí dobu kratší než 24 hodin a rovněž tak Šimunič (1967) píše, že v Jugoslávii se inseminují prvníčky za 15 až 18 hodin od počátku nastoupení reflexu pasivity, tj. o 6 až 9 hodin dříve než prasnice.

## Technika inseminace

V současné době se prasnice uměle osemeňují dvěma způsoby. V prvním případě se ředěné sperma vpravuje do pohlavních orgánů jednorázově, v druhém případě frakčně.

Frakční způsob inseminace propracoval a teoreticky zdůvodnil především Kvasnickij a kol. (1962). Princip uvedené metody spočívá na tom, že po zavedení inseminačního katedru do pohlavních orgánů prasnice se nejdříve deponuje dávka neředěného nebo jen částečně rozředěného semene v objemu 35 až 40 ml pro prvníčku a 50 ml pro prasnici s celkovým počtem 3 až 5 miliard spermií a ihned po této dávce se zavádí 50 až 100 ml ředidla. Toto ředidlo nemá za úkol rozředit semeno, nýbrž naplnit děložní rohy a tlačit koncentrované semeno před sebou k vejcovodům. Po ředidle se doporučuje vpravit do pohlavních orgánů ještě 50 až

100 ml, resp. 200 až 250 ml vzduchu, který má za úkol omezit a zpomalit zpětný výtok ředidla po inseminačním zákroku.

Vlastní inseminační úkon se dělá na prasnici, fixované v kleci, pomocí kovové sondy, kterou prochází gumová hadička, napojená na speciální inseminační aparaturu. Katetr je zakončen hruškovitým gumovým násadcem. Zavádí se po očištění vulvy a rozevření stydkých pysků po horní klenbě do krčku děložního. Místo deponování je v podstatě určováno tvarem a silou katetrů, používaných k inseminaci. Zavedený katetr s gumovým zakončením se během úkonu udržuje pod určitým tlakem v pohlavních orgánech, čímž je zabráněno zpětnému výtoku semene v době, kdy krček děložní, který se v období říje arytmiicky stahuje, je uzavřen.

Při jednoduchém způsobu inseminace se deponuje do pohlavních orgánů prasnice 50 až 60 ml neředěného spermatu (Riddell, Swan 1960) nebo naředěného semene o objemu 100 až 150 ml pod mírným tlakem, nebo za využití samospádu při výše pozdvižené nádobce.

K inseminaci se používají nejčastěji katetry gumové nebo z umělých hmot, s rovným nebo hruškovitým zakončením, o délce 35 až 50 cm a sílce 5 až 11 mm (Kozumplík 1961, Podaný a kol. 1966). Aamdal a Högset (1957) používají 50 cm dlouhý katetr, opatřený na konci roztažitelným balónkem.

Část autorů (Götze 1949, Ožin 1959 aj.) doporučuje při inseminačním úkonu fixovat prasnici v kleci, zatímco v poslední době se klade důraz na klidné zacházení s prasnici, která má být k osemenění umístěna v boxu vedle kance, aby byl reflex nehybnosti výraznější (Šimunič 1967). Není-li možná stimulace kancem, má se inseminovat klidně v prostředí, na něž je prasnice zvyklá (Dziuk, Henshaw 1958).

K dosažení silného pohlavního vzrušení bez přítomnosti kance se ještě doporučuje před inseminací nebo v jejím průběhu masáž klitorisu (Hess a kol. 1960), nebo zatížení zádě či beder prasnice (Madden 1961) aj. Také pach sekretu prepuťálního vaku kance působí stimulačně na říjící se prasnici.

## Výsledky inseminace

Z přehledu literatury je patrné, že výsledky umělého osemenování se mnohdy liší podle toho, došlo-li k inseminaci v tzv. laboratorních podmínkách nebo přímo v terénu. Rozdílné výsledky jsou patrné především v prvních pracech au-

torů, zatímco po překonání určitých, zpravidla organizačních potíží v terénu, jsou difference mezi výsledky zcela nevýznamné.

Jak uvádí Derivaux (1959), dosáhl Du Mesnil Du Buisson a Dauzier při inseminaci v tzv. laboratorních podmínkách 60 až 63% koncepce, zatímco v terénu 20 až 35%. Také Polge (1956) a Campbell (1961) zaznamenali v terénu výsledky o 20 až 30 % horší.

Na našem pracovišti jsme v laboratorních podmínkách dosáhli 76,1 % březosti po první inseminaci, zatímco v terénu bylo dosaženo 62,1 % (Příbyl, Kozumplík 1962). V poslední době se však i naše výsledky v terénu shodují s výsledky laboratorními. Podobné zkušenosti získal i Podaný a kol. (1966). Hancock (1959) ve své studii uvádí, že z 51 osemeněných prasnic zabřezlo 76,2 %, Dun Vej (1958) zaznamenal z 385 inseminovaných prasnic březost u 69,2 %. Goting (1959) při zjišťování říje kancem dosáhl 68,6 % koncepce, zatímco u skupiny 169 prasnic, kde říje byla určována bez přítomnosti kance, zaznamenal 62,7 % koncepce.

Ito a kol. (1948), cit. podle Polgeho (1956), zaznamenali rozdíly v zabřeznutí prasnic ve vztahu ke stáří použitého semene. Jestliže došlo k inseminaci semenem starým do 24 hodin, bylo dosaženo 76,8 % koncepce, od 24 do 48 hodin

62,5 % a od 48 do 75 hodin jen 28,6 % zabřeznutí. Obecně se má zato, že výsledky inseminace 24 hodin starým semenem jsou asi o 10 % horší než se semenem čerstvým (Bane 1959, Polge 1957). Menší procento zabřeznutí je zaznamenáno řadou autorů při inseminaci prasnic (Goting 1959, Jakobsen 1959, Rothe 1964 aj.).

Velmi dobré výsledky při inseminaci prasnic vykazují sovětští autoři, kde zásluhou akad. Kvasnického, Milovanova a jiných byla velmi podrobně zpracována organizace umělého osemenování prasnic. Tak Kvasnickij a kol. (1962) uvádí, že v průměru je dosahováno 84% březosti po první inseminaci a na jeden vrh připadá 10 až 12 selat. Podobné výsledky uvádí i Sokolovská (1962) aj., ale i autoři v Japonsku a v poslední době také v Jugoslávii.

Za předpokladu, že kvalita semene odpovídá požadavkům kladeným na ejakuláty použitelné k inseminaci a k umělému osemenování dochází ve vhodnou dobu, neliší se jak procento zabřeznutí, tak i počet selat ve vrhu od stejných ukazatelů v přirozené plemenitbě.

Vzhledem k přednostem, které má inseminace před přirozenou plemenitbou, přestává být i v chovu prasat jen vědeckou záležitostí a nabývá velkého národohospodářského významu, podobně jako je tomu i u umělého osemenování skotu.

## Literatura

- AAMDAL J., 1960, Die künstliche Besamung beim Schwein. Referát Fachtagung für künstl. Besamung in Wels, Rakousko, 31. VII.
- AAMDAL J., HÖGSET I., 1957, Artificial insemination in swine. J. Amer. veter. med. Assoc. 131 : 59-64.
- BAIER W., GRAUVOGEL A., 1959, Samenentnahme beim Eber in der tierärztlichen Praxis. B. M. T. W. 8 : 150-152.
- BANE A., 1959, Some results of studies on semen of young boars and on artificial insemination in pigs. Ann. Zootechnie, Ser. D, Suppl.: 15-20.
- BONADONNA T., 1957-1958, Nozioni di fisiopatologia della riproduzione e di fecondazione artificiale degli animali domestici. Edizioni Progresso Zootecnico 2 : 1654-1661.
- BONADONNA T., CURTO G. M., 1960, Observations on the structure of boar sperm. Zuchthyg., Fortpfl. Stör. und Bes. der Haust. 4 : 31-39.
- CAMPBELL E. A., 1961, Observations on certain aspects of A. I. in pigs. IV. Intern. Congr. on Animal Reprod. The Hague, Vol. IV.
- ČERNE F., 1967, Odredivanje optimalnog vremena za osemenjavanje svinja goveda pomoću merenja električnog otpora vaginalne sluzokože. Referát, Simpozijum o problemima reprodukcije stoke ve Vrnjačke banje, Jugoslavija 17. XI.
- DERIVAUX J., 1959, L'insémination artificielle porcine. Ann. de Med. Vet. 6 : 369-393.
- DU MESNIL DU BUISSON F., DAUZIER L., 1958, Maintien du pouvoir fécondant du sperme de Verrat en présence de gaz carbonique. C. R. Acad. Sci. 247 : 2472-2475.
- DUN VEJ, 1958, Pervyje šagi po iskusstvennomu osemeneniju v Kitaje. Životnovodstvo 11 : 84-87.
- DURMON J., 1958, Elektroejakulace u kanců. Diss. Vet. fak. Brno.

- DZIUK P. J., 1958, Dilution and storage of boar semen. *J. Anim. Sci.* 17: 548-553.
- DZIUK P. J., GRAHAM E., PETERSON E., 1954, Some observations in collection of semen from bulls, goats, boars and rams by electrical stimulation. *Vet. Medicina* 9: 455-458.
- DZIUK P. J., 1959, Artif. insemin. in swine. *Shwest Vet.* 12: 133-135.
- DZIUK P. J., HENSHAW G., 1958, Fertility of boar semen artificially inseminated following in vitro storage. *J. Anim. Sci.* 17: 554-558.
- FOOTE R. H., YOUNG D. C., TURKHEIMER A. R., BRATTON R. W., 1959, Collection, preservation and artificial insemination of boar semen. *Ann. Zootechnie, Ser. D., Suppl.*, 27-30.
- GÖTZE R., 1949, Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere. Hannover, 603 s.
- GOTING W. M., 1959, Een K. I. proef. bij varkens in Overijssel. *Tijdschr. Diergeneesk.* 84: 163-178.
- GRAUVOGL A., 1961, Überprüfung der männlichen Geschlechtsfunktionen beim Schwein. *Zuchthyg. Fortpfl. u. Bes. der Haustiere* 5: 275-279.
- GROVE D., TIEFENBACH B., 1961, Die Blaulicht-Fluoreszenzmikroskopie als Hilfsmittel bei der Samenuntersuchung. *D. T. W.* 68: 431-434.
- HAHN J., 1958, Zur Samenentnahme beim Eber. *Zuchthyg. Fortpfl. Stör. u. Bes. der Haustiere* 2: 71-74.
- HANCOCK J. L., 1957, The morphology of boar spermatozoa. *J. Roy. Micr. Soc.* 76: 84-97.
- HANCOCK J. L., 1959, Pig Insemination Technique. *Vet. Rec.* 71: 523-527.
- HANSEN L. H., JAKOBSEN K. F., 1958, Forsg. med. artificiël insemination i svineavlten. *Nordiska veterinärmötet VIII. Sekt. D.* 27.
- HERRICK J. B., 1949, Semen examination to determine fertility in swine. *Vet. Med.* 44: 393-394.
- HESS E. A., LUDWICK T. M., TEAGUE H. S., 1960, Motility of boar spermatozoa as influenced by semen freezing procedures. *J. Anim. Sci.* 19: 926-931.
- HOFFMANN H., 1959, Versuche zur Frostkonservierung des Ebersamens. *Vet. Diss. München.*
- HOLT A. F., 1959, Observations on artificial insemination of pigs. *Veterin. Rec.* 71: 184-187.
- HOLST S. J., 1949, Sterility in boars. *Nord. Veterinärmed.* 1: 87-120.
- ITO S., NIWA T., KUDO A., 1948a, On the method of collection of semen and the condition of ejaculation. *Zoot. Exp. Sta. Res. Bull.* 55: 1-15.
- ITO S., NIWA T., KUDO A., 1948b, On the method of injection of semen and the results in fecundation. *Zoot. Exp. Sta. Res. Bull.* 55: 57-74.
- JAKOBSEN F. K., 1959, A danish experiment of artificial insemination of swine. *Ann. Zoot., Ser. D, Suppl.*: 37-41.
- JOHARI M. P., 1956, The gel mass in the semen of the boar. *Vet. Rec.* 68: 158-163.
- KÁBRT J., 1959, Výživa a dietetika dom. zvířat. *Script. Praha*, 350 s.
- KOZUMPLÍK J., 1961, Inseminace prasat. *Kand. práce Vet. fak. Brno.*
- KOZUMPLÍK J., 1964, Spermiogram kanců s poruchami plodnosti. *Habil. práce Vet. fak. Brno.*
- KOZUMPLÍK J., 1964, Spermiogram kanců s poruchami plodnosti. *Habil. práce Vet. Med. (Praha)* 7: 461-466.
- KOZUMPLÍK J., DVOŘÁK J., 1965, Vliv frekvence odběru ejakulátu kance na hladinu kyseliny askorbové v semeni. *Vet. Med. (Praha)* 10: 595-604.
- KÖNIG I., 1960, Künstliche Besamung auch bei Schweinen. *Tierzucht* 14: 491-494.
- KVASNICKIJ A. V., KOŇUCHOVÁ V. A., KOŇUCHOVÁ L. A., 1962, Umělé osemeňování prasnic. *Praha*, 250 s.
- LAGERLÖF N., CARLQUIST H., 1961, The semen of boars of the Yorkshire breed between the ages of five and nine months. *IV. Int. Congr. of Animal Reprod. The Hague, Vol. IV.*
- MADDEN D. H. L., 1959, Field experience of pig A. I. in Hampshire. *Ann. Zoot., Ser. D, Suppl.*: 59-67.
- MADDEN D. H. L., 1961, A method obtaining a high fertility with the artificial insemination of farm pigs. *IV. Int. Congr. of Anim. Reprod. The Hague, Vol. IV.*
- MÁŠEK N., 1960, Příspěvek k nové technice odběru ejakulátu kanců k studiu některých vlivů na biologii spermií. *Kand. dis. práce, Brno.*
- MC KENZIE F. F., 1931, A method for the collection of boar semen. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 31: 244-246.

- MELROSE D. R., O'HAGAN C., 1959, Some observations on the collection of boar semen and its use for artificial insemination. *Ann. Zoot. Ser. D, Suppl.* 69-79.
- MILOVANOV V. K., 1957, Technika iskusstvennogo osemenenija svinej. *Svinovodstvo* 2 : 14-19.
- MILOVANOV V. K., SYTINA M. V., KULEŠOVA V. G., 1960, O metode sochranenija semeni posredstvom immobilizacii kislotaami bez primenenija choloda. *Životnovodstvo* 1 : 18-27.
- NIWA T., MIZUHO A., SOEJIMA A., 1959, Studies on the artificial insemination in swine. *Bull. Nat. Inst. Agr. Sci.* 18 : 45-56.
- OŽIN F. V., 1959, Iskusstvenoe osemenenie selskochozjajstvennyh životnych. Moskva, 428 s.
- PAREDIS F., 1959, A comparison between three diluents for boar semen. *Ann. Zoot. Ser. D* : 111-112.
- PASZTOR L., 1955, Ondónyerés sertésfantommal. *Allattenyésztés*, 4 : 103-108.
- PITKJANEN J. G., 1961, Novoe v oplodotvorenii i povyšennii plodovitosti svinej. Moskva, 185 s.
- PODANÝ J., 1964, Příspěvek k inseminaci prasat. V. Mez. kongr., Trento, 4 : 562-565.
- PODANÝ J., MUZIKANT J., 1967, Studium kritérií základních hodnot kvality kančích ejakulátů. *Vet. Med. (Praha)* 12 : 417-426.
- PODANÝ J., MUZIKANT J., KOTAS J., ZAVŘELOVÁ L., 1966, Stanovení základních kritérií optimálního období inseminace u prasnic, kvality kančího ejakulátu a hodnocení inseminační metody. Závěr. zpráva úkolu R II 22/1, VÚVL, Brno.
- POLGE C., 1956, Artificial insemination in pigs. *Vet. Rec.* 68 : 62-76.
- PŘIBYL E., KOZUMPLÍK J., 1962, Erfahrungen bei der künstlichen Besamung von Schweinen unter Praxisbedingungen. XXV<sup>o</sup> ANNO Dalla fondazione dell' istituto sperimentale Italiano: 401-405.
- RADFORD P., 1961, The artificial insemination of pigs in the field. *Vet. Rec.* 73 : 985-992.
- REĐKIN A. P., 1954, Chov prasat. Praha, 387 s.
- RIDDEL-SWAN J. H., 1960, Artificial insemination of pigs in Japan. *The Brit. Vet. J.* 12 : 443-447.
- ROB O., 1960, Příspěvek ke kontrole plodnosti plemenných kanců. *Veterinářství* 10 : 20-23.
- ROB O., 1963, Morfologické vyšetření spermií v diagnostice poruch plodnosti plemenných kanců. *Živ. výroba* 8 : 717-726.
- RODIN I. M., 1960, Metodické ukazania po iskusstvennomu osemenenii svinej. Kuzminki, 27 s.
- RODIN I. M., LIPATOV V. I., KOMISAROV N. V., 1931, Problema iskusstvennogo osemenenija svinej. *Veterinarnyj specialist na socialističeskoj strojke*, 9-10.
- ROTHER K., 1964, Vývoj a stav umělého osemenování u prasat. *Studijní informace, Živočišná výroba* 3-4 : 1-94.
- SIGNORET J. P., DU MESNIL DU BUISSON F., BUSNEL R. S., 1960, Rôle d'un signal acoustique de verrat dans le comportement reactionnel de la truie en oestrus. *C. R. Acad. Sci.* 250 : 1355-1357.
- SMIDT D., 1961, Untersuchungen der Sexualpotenz des Schweines mit dem Ziel, eine Methode zur wirksameren Selektion auf Fruchtbarkeit beim Schwein zu erarbeiten. IV. Int. Congr. on Anim. Reprod. The Hague, Vol. IV.
- SMIDT D., 1965, Die Schweinebesamung. Hannover, 369 s.
- SOKOLOVSKAJA I. I., 1962, Isskusstvennoe osemenenie svinej. Moskva, 213 s.
- SPRANK W., 1962, Über Samengewinnung und Penisverlagerung am narkotisierten Eber mittels einwirkender elektrischer Ströme. *Vet. Diss. Hannover.*
- STRATMAN F. W., SELF H. L., SMITH V. R., 1958, Fertilization rates obtained with boar semen stored for zero and twelve hours. *J. Anim. Sci.* 17 : 3-5.
- ŠIMUNIČ B., 1967, Zkušenosti s umělou inseminací prasat v Jugoslávii. Referát na Celostátním semináři o aktuálních otázkách umělé inseminace hospodářských zvířat. Brno.
- TURKHEIMER A. R., YOUNG D. C., FOOTE R. H., 1958, Technics for semen collection; semen production in young boars. *Cornell vet.* 48 : 291-299.
- VAN DEMARK N. L., SHARMA U. D., 1956, Preliminary report on the preservation of bovine semen at room temperature. *Journ. of Anim. Sci.* 255 : 1212.
- VERA CRUZ, 1959, Semen collection by electrical stimulation in boars. *The Philipp. Agr.* 43 : 225-235.
- VYHNÁLEK J., 1962, Vliv teploty a tlaku umělé pochvy na objem a kvalitu ejakulátu kance. *Vet. Diss. Brno.*

WIERZCHOSZ E., 1968, Porównanie metod pobierania nasienia od knurów. Med. Weterynaryjna 2 : 109-112.  
WILLEMS C. M., 1959, K. I. bij varkens. Tijdschr. Diergeneesk. 84 : 208-212.

Došlo dne 26. 6. 1968

КОЗУМПЛИК Й. (СХИ, Ветеринарный факультет, кафедра акушерства и гинекологии, Брно, Чехословакия) Современное состояние и опыт с искусственным осеменением свиней. Вет. Мед. (Прага) 14 (6) : 383-392, 1969.

В представленной работе автор описывает собственный опыт с взятием эякулята хряков, с оценкой качества семени, техникой искусственного осеменения свиноматок и наконец приводит результаты осеменения свиноматок. Путем сравнения результатов наших и зарубежных авторов получен полный обзор современной проблематики искусственного осеменения свиней. После первого осеменения было достигнуто 76,1 % беременности в так называемых лабораторных условиях и 62,1 % беременности в условиях практики.

взятие семени хряка; оценка качества эякулята; техника искусственного осеменения; результаты искусственного осеменения свиноматок

KOZUMPLÍK J. (University of Agriculture, Veterinary Faculty, Department of Obstetrics and Gynecology, Brno Czechoslovakia) *Experience and the Present State of Insemination of Pigs*. Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 383-392, 1969.

The author presents his own experience with the collection of boar semen, with the assessment of the quality of semen, and with the methods of insemination of sows. Results of insemination are given. A comparison of the results published in Czechoslovakia with foreign literature provides an integrated survey of the problems pertaining to insemination of pigs. First insemination resulted in the conception rate of 76.1 % under so-called laboratory conditions, and 62.1 % in field.

boar semen collection; assessment of the quality of ejaculate; artificial insemination method; results of insemination of sows

KOZUMPLÍK J. (Landw. Hochschule, Veterinärfakultät, Lehrstuhl für Geburtswesen und Gynäkologie in Brno, Tschechoslowakei.) *Derzeitiger Stand und Erfahrungen mit der künstlichen Besamung der Schweine*. Vet. Med. (Praha) 14 (6) : 383-392, 1969.

In der vorliegenden Arbeit werden eigene Erfahrungen mit der Entnahme des Ejakulats von Ebern, der Beurteilung der Samenqualität, der Besamungstechnik bei Säuen dargelegt und schließlich die Ergebnisse der Besamung von Säuen angeführt. Durch Vergleich mit den Resultaten unserer und ausländischer Autoren wurde eine Gesamtübersicht über die derzeitigen Probleme der künstlichen Besamung von Schwein gewonnen. Nach der ersten Besamung wurden 76,1 % der besamten Säue unter Laborbedingungen und 62,1 % der Säue in der Praxis trächtig.

Ebersamenentnahme; Bewertung der Qualität des Ejakulats; Technik der künstlichen Besamung; Ergebnisse der künstlichen Besamung von Säuen.

---

#### Adresa autora:

Doc. MVDr. Jaroslav Kozumplík, CSc., VŠZ, veterinární fakulta, katedra porodnisko-gynekologická, Brno, Palackého 1-3  
Přednosta: Doc. MVDr. Eduard Kudláč, CSc.

---

Rukopis odevzdán k tisku 25. 3. 1969 — Podesáno k tisku 14. 7. 1969

|                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Hejlíček K., Ullrichová J., Zendulka M.: Intravenózní infekce slepic <i>Mycobacterium avium</i> . . .                                               | 333 |
| Černík K., Rajtár V.: Výběr virového kmene pro přípravu inaktivované vakcíny proti pseudomoru drůbeže . . .                                         | 341 |
| Pospíšil Z., Mesároš E., Štěpánek J.: Diagnostika virové gastroenteritidy prasat z histologických řezů pomocí přímé imunofluorescenční metody . . . | 351 |
| Dvořák M., Oplištil M., Patka J., Věžník Z.: Klinické, hematologické a biochemické změny při adrenalektomii u telat . . .                           | 357 |
| Blažek K.: Postižení jater a některých jiných orgánů při invazi motolice <i>Fascioloides magna</i> (Bassi, 1875) . . .                              | 369 |
| Petr G., Jiran E.: Stabilita chromatografických vlastností viru infekční hepatitidy psů . . .                                                       | 375 |

## Souborné přehledy:

|                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| Kozumplik J.: Současný stav a zkušenosti s umělým osemeňováním prasat . . . | 383 |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Гейличек К., Ульрихова Й., Зендулка М.: Интравенозная инфекция кур <i>Mycobacterium avium</i> . . .                                                             | 338 |
| Черник К., Райтар В.: Отбор вакцинального штамма вируса для изготовления инактивированной вакцины против псевдо чумы птиц . . .                                 | 348 |
| Поспишил З., Месарош Е., Штепанек Я.: Диагностика вирусного гастроэнтерита свиней из гистологических срезов при помощи прямого метода иммунофлуоресценции . . . | 355 |
| Дворжак М., Опليштил М., Патка Й., Вежник З.: Клинические, гематологические и биохимические изменения при адrenaлектомии у телят . . .                          | 366 |
| Блажек К.: Поражение печени и некоторых других органов при инвазии сосальщика <i>Fascioloides magna</i> (Bassi, 1875) . . .                                     | 373 |
| Петр Г., Йиран Е.: Стойкость хроматографических свойств вирусов инфекционного гепатита собак . . .                                                              | 380 |
| Козумплик Й.: Современное состояние и опыт с искусственным осеменением свиней . . .                                                                             | 392 |

## CONTENT

|                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Hejlíček K., Ullrichová J., Zendulka M.: Intravenous Infection of <i>Mycobacterium Avium</i> in Hens . . .                                                    | 338 |
| Černík K., Rajtár V.: Selection of a Virus Strain for the Preparation of an Inactivated Vaccine against Newcastle Disease . . .                               | 349 |
| Pospíšil Z., Mesároš E., Štěpánek J.: The Diagnostics of Virus Gastroenteritis of Pigs from Histological Cuts Using the Direct Immunofluorescent Method . . . | 355 |
| Dvořák M., Oplištil M., Patka J., Věžník Z.: The Clinical, and Biochemical Changes Caused by Adrenalectomy in Calves . . .                                    | 366 |
| Blažek K.: Disturbances in Liver and Some Other Organs Invaded by the Fluke <i>Fascioloides magna</i> (Bassi, 1875) . . .                                     | 373 |
| Petr G., Jiran E.: The Stability of the Chromatographic Properties of the Virus of Infectious Hepatitis in Dogs . . .                                         | 381 |
| Kozumplik J.: Experience and the Present State of Insemination of Pigs . . .                                                                                  | 392 |

## INHALT

|                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Hejlíček K., Ullrichová J., Zendulka M.: Intravenöse Infektion der Hennen durch <i>Mycobacterium avium</i> . . .                      | 338 |
| Černík K., Rajtár V.: Auswahl des Virusstammes für die Herstellung einer inaktivierten Vakzine gegen die atypische Geflügelpest . . . | 349 |

|                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Pospíšil Z., Mesároš E., Štěpánek J.: Diagnostik der Virusgastroenteritide bei Schweinen aus den histologischen Schnitten mittels der direkten Immunofluoreszenzmethode . . . . . | 356 |
| Dvořák M., Oplištil M., Patka J., Věžník Z.: Klinische, hämatologische und biochemische Veränderungen bei der Adrenalektomie der Kälber . . . . .                                 | 367 |
| Blažek K.: Beschädigung der Leber und einiger anderen Organe bei Invasion des Leberegels <i>Fascioloides magna</i> (Bassi, 1875) . . . . .                                        | 373 |
| Petr G., Jiran E.: Die Stabilität chromatographischer Eigenschaften des Virus der infektiösen Hepatitis der Hunde . . . . .                                                       | 381 |
| Kozumplík J.: Derzeitiger Stand und Erfahrungen mit der künstlichen Besamung der Schweine . . . . .                                                                               | 392 |

## TABLE DES MATIÈRES

|                                                                                                                                                                                                           |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Hejliček K., Ullrichová J., Zendulka M.: Infection intraveineuse des poules due à <i>Mycobacterium avium</i> (res. An, Al/338)                                                                            |  |
| Černík K., Rajtár V.: Sélection d'une souche virale pour la préparation du vaccin inactivé dans la lutte contre la pseudo-peste aviaire (res. An, Al/349)                                                 |  |
| Pospíšil Z., Mesároš E., Štěpánek J.: Diagnostic de la gastro-entérite à virus des porcs, établi sur les tranches histologiques au moyen de la méthode d'immunofluorescence directe (res. An/355, Al/356) |  |
| Dvořák M., Oplištil M., Patka J., Věžník Z.: Modifications cliniques, hématologiques et biochimiques lors de l'adrénalectomie des veaux (res. An/366, Al/367)                                             |  |
| Blažek K.: Altération du foie et de quelques autres organes lors de l'invasion de la grande douve — <i>Fascioloides magna</i> (Bassi 1875) (res. An, Al/373)                                              |  |
| Petr G., Jiran E.: Stabilité des propriétés chromatographiques du virus de l'hépatite infectieuse des chiens (res. An, Al/381)                                                                            |  |
| Kozumplík J.: Etat actuel et expériences avec l'insémination artificielle des porcs (res. An, Al/392)                                                                                                     |  |