

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

✓

11

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

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDELSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Řídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král, (předseda), prof. MVDr. Kolo-
man Boďa, 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, MVDr. Jaromír Lát,
CSc., MVDr. Martin Lis, CSc., MVDr. Andrej Mačička,
CSc., 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 Václavíčková

© Ústav vědeckotechnických informací, Praha 1969

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje stu-
die, rozboru a vědecká pojednání o vyřešených úkolech vý-
zkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav vědecko-
technických informací. Vychází měsíčně. Redakce: Praha 2,
Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné Kčs 120,—

Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзо-
ры, анализы и научные статьи о разрешенных заданиях по научному
исследованию в области ветеринарии. Издает Институт научно-
технической информации. Выход в свет ежемесячно. Редакция
Прага 2, Слезска 7.

The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publishes
studies, analyses and scientific treatises about the solved
research tasks in the line of the veterinary medicine. Pu-
blished by the Institute of Scientific and Technical Inform-
ation. Issued monthly. Editorial office Prague 2, Slezská 7

Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Ab-
handlungen über die gelösten Forschungsaufgaben auf dem
Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben vom Institut
für wissenschaftlich-technische Informationen. Erscheint mo-
natlich. 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 scienti-
fiques et techniques. Paraît une fois par mois. Rédaction
Prague 2, Slezská 7

ÚČINOK TETRAMISOLU NA OFTALMOHELMINTY HOVÄDZIEHO DOBYTKA *THELAZIA RHODESI* (DESMAREST 1827)

J. Corba

SAV, Helmintologický ústav, Košice

CORBA J.: Účinnok tetramisolu na oftalmohelminity hovädzieho dobytku *Thelazia rhodesi* (Desmarest 1827). Vet. Med. (Praha) 14 (11): 601-606, 1969.

V práci sa referuje o výsledkoch skúšania tetramisolu* (2, 3, 5, 6-tetrahydro-6-phenylimidazo) 1, 1, 6 thiazole (hydrochlorid) na očné červy *Thelazia rhodesi* v pokusoch *in vitro* a *in vivo*. Hladiny tetramisolu v slzách po aplikácii terapeutickej dávky 15 mg/kg *per os* v intervaloch od druhej do štvrtej hodiny po aplikácii boli signifikantne vyššie ako irreverzibilne účinné koncentrácie tetramisolu *in vitro* v tých istých intervaloch. V pokusoch na zvieratách prirodzene invadovaných červami *Thelazia rhodesi* sa potvrdila predpokladaná dobrá účinnosť tohto antihelminтика a zároveň sa dokázala aj korelácia medzi účinkami tetramisolu *in vitro* a *in vivo*.

Thelazia rhodesi (Desmarest 1827); tetramisol; *in vitro*; *in vivo*; polarografická metóda; invázne larvy; reverzibilný; irreverzibilný; sukcinátdehydrogenáza; korelácia

Thiepont a kol. objavili v roku 1966 v Belgicku pri sledovaní antihelmintickej účinnosti aminothiazolového derivátu (thiazothrinol alebo R 6438) nové širokospektrálne antihelmintikum — tetramisol. Je to 2,3,5,6-tetrahydro-6-phenylimidazo (1,1,6 thiazole) hydrochlorid. Veľkou výhodou tejto látky je jej pomerne nízka toxicita a jednoduchý spôsob aplikácie — *per os*. Tetramisol bol doteraz vyskúšaný s veľkým úspechom proti celému radu gastrointestiálnych a pľúcnych nematódov u zvierat aj u ľudí. Z týchto dôvodov sme vyskúšali tetramisol proti ďalšiemu parazitickému nematódovi — *Thelazia rhodesi* (Desmarest, 1827), ktorý spôsobuje na Slovensku často sa vyskytujúce verminózne keratokonjunktivitídy u dobytku. Tento druh má podľa zistenia Hovorku (1963) najväčšiu extenzitu výskytu (62,7 %). Okrem neho na našom území v menšej miere parazitujú aj *Thelazia skrjabini* (Erschow 1928) a *Thelazia gulosa* (Railliet a Henry 1910).

Doteraz používaná dehelmintizácia telaziózneho dobytku metódou výplachu nazolakrimálneho kanála podľa Hovorku (1958) bola účinná, ale vyžadovala väčší počet pracovníkov na fixáciu zvierat a bola náročná aj na prevedenie. Preto sme sa snažili hľadať jednoduchšie metódy dehelmintizácie použitím novších a účinných antihelminťík (methyridin, trichlorfon, piperazin adipat, cyanacethydrazid, dietylkarbamazín fosfát a citrát, ditiazanin jodid a tetramisol), z ktorých posledne menovaný preparát sa zdá byť pre svoju dobrú účinnosť a jednoduchú aplikáciu najvhodnejší.

V prvej časti práce sme vyskúšali účinky klesajúcich koncentrácií tetramisolu v pokusoch *in vitro* na dospelé a larválne štádia *Thelazia rhodesi*. V druhej časti

* Výrobca ICI, Macclesfield, Anglicko

práce sme stanovovali množstvo vylučovaného tetramisolu v slzách hovädzieho dobytká po perorálnej aplikácii 15 mg/kg v rôznych intervaloch. V poslednej časti práce sme vyskúšali účinnosť tetramisolu u dobytká prirodzene nakazeného červami *Thelazia rhodesi*.

MATERIÁL A METODIKY

a) Pokusy *in vitro* sme robili s inváznymi larvami a s dospelými červami, ktoré sme získali z očí dobytká, ktorému sa ihneď po odporazení vypreparoval celý spojivkový vak aj s prídavným slzným aparátom. Pitvou podľa Treťjakovej (1965) sme získali červy, ktoré sme vkladali do nádobiek, ktoré obsahovali 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 a 10 mg/ml tetramisolu. Ako zriedovadlo sme použili uchovávacie médium vlastnej kompozície (Čorba, Lešťan 1969), v ktorom nám červy preživali v priemere 10krát dlhšie ako v doteraz používaných médiách. Do 10 ml každého zriedenia antihelmintika sme vložili po 6 exemplárov vitálnych lariev alebo dospelých červov. Helmintov sme sledovali v skúšanom zriedení až do vymiznutia spontánneho pohybu posledného červa, začím sme ich preložili do nášho média bez antihelmintika a sledovali či a za aký čas sa spontánny pohyb obnoví. Keď sa spontánny pohyb červov do 8 hod. od začiatku pokusu obnovil, považovali sme účinnok antihelmintika za reverzibilný. Ak sa neobnovil spontánny pohyb červov počas uvedeného intervalu, bol účinok irreverzibilný a červy sme považovali za mŕtve.

Za kontrolu slúžili červy vložené do nášho média bez antihelmintika, držané za rovnakých podmienok ako v pokuse (pH 7,2–7,5; 28 °C).

b) Koncentráciu tetramisolu v slzách hovädzieho dobytká stanovili v Biochemical-Pharmacology Department ICI v Anglicku polarografickou metódou podľa Holbrooka a Scalesa (1967). Piatim zvieratám vo veku dva až tri roky, slovenského strakatého plemena, sme podali *per os* po 15 mg/kg tetramisolu a potom v intervaloch 30 min., 1, 2 a 4 hod. sme dráždením spojivky jemným štetcom získali 0,5 až 1 ml slz, ktoré sme odoslali do horeuvedeného laboratória.

c) Pokusy *in vivo*. Tetramisol sme preskúšali v stáde dobytká slovenského strakatého plemena vo veku okolo dvoch rokov, kde sa enzooticky vyskytlo očné onemocnenie. V počiatočnom štádiu ochorenia sa zisťovalo nadmerné slzenie, mierny opuch viečok a katar očnej spojivky. Výtok z očí bol spočiatku číry a vodnatý, neskôr mucinózny a pripomínal na vzhľad želatínu. Sliznica spojivky bola špinavočerveno sfarbená, so silne injikovanými cievami. U niektorých zvierat sme na spojivke zistili patechiálne krvácaniny. Viečka nápadne opuchli a spolu s hlienovo-hnisavým výtokom, ktorý usýchal na okolí očí, spôsobili, že niektoré zvieratá nemohli otvoriť oči. U piatich zvierat sme zistili, že sa zápalový proces rozšíril aj na rohovku, na ktorej sa objavil sivožltý difúzny zákal. Choré zvieratá prejavovali výraznú fotofóbiu a bránili sa prehliadke očí. Aj celkový zdravotný stav zvierat bol narušený a prejavoval sa inapetenciou a chudnutím. V spojivkovom vaku chorých zvierat sme zistili červy *Thelazia rhodesi* s celkovou intenzitou invázie 10 až 17 exemplárov.

Všetky choré zvieratá sme umiestnili v zatemnenej maštali a rozdelili do troch skupín. V prvej skupine bolo päť zvierat, ktorým sme podali jednorázove 15 mg/kg tetramisolu *per os*. V druhej skupine sme piatim zvieratám podali dvakrát po 15 mg/kg tetramisolu *per os* v 24hod. intervale. Tretia skupina piatich zvierat bola kontrolná.

VÝSLEDKY

a) Účinok tetramisolu v najvyšších skúšaných koncentráciách (10 až 1 mg/ml) bol okamžitý a invázne larvy aj dospelé červy sa prestali pohybovať ihneď po ich vložení do týchto roztokov. Najnižšia koncentrácia tetramisolu počas 8hodinového pokusu bola 1 µg/ml.

Účinok tetramisolu na invázne larvy aj dospelé červy bol irreverzibilný, keďže sa neobnovil spontánny pohyb červov po ich preložení do uchovávacieho média bez antihelmintika zo žiadneho zo skúšaných zriedení tejto látky. Invázne larvy aj dospelé červy boli takmer rovnako citlivé k účinkom tetramisolu v skúšanej sérii zriedení (tab. I).

b) Polarografickou metódou podľa Holbrooka a Scalesa (1967) boli po aplikácii 15 mg/kg tetramisolu *per os* v slzách hovädzieho dobytká

v intervaloch 30 min., 1 2 a 4 hod. stanovené hladiny tetramisolu. Najvyššia hladina tejto látky bola po dvoch hod. od aplikácie $17,5 \pm 2,0$ µg/ml. Štyri hodiny po podaní klesla hladina tetramisolu približne na rovnakú hodnotu ako bola zistená jednu hodinu po aplikácii (tab. II).

c) V prvej skupine zvierat, kde sme jednorázove podali po 15 mg/kg tetramisolu, sme už na druhý deň po aplikácii pozorovali nápadné zlepšenie zdravotného stavu zvierat. Výtoky z očí postupne prestávali a sliznica spojivky strácala špinavočervené sfarbenie a lesk. Na tretí až štvrtý deň sa obnovila aj chuť k potrave. Na 7. deň po podaní tetramisolu vymizli bez následkov všetky klinické príznaky telaziózneho ochorenia. V druhej skupine, po dvojnásobnom podaní tetramisolu v dávke po 15 mg/kg v 24hod. intervale, sa zvieratá rapídne uzdravovali. Výtoky z chorých očí sa strácali a na piaty deň sa stratil aj zákal rohovky. Sliznica spojivky sa postupne obnovovala. Za 8 až 9 dní po podaní tetramisolu sa zvieratá úplne uzdravili a normálne videli. V kontrolnej skupine sa u jedného zvierata zdravotný stav náhle zhoršil. Rohovkový vred na pravom oku perforoval a obsah prednej očnej komory vytekol. Na rohovke ľavého oka sa vytvoril kruhový zákal a zviera takto obojstranne oslepo. U ostatných zvierat tejto skupiny sa zdravotný stav zlepšoval len veľmi pomaly.

I. Účinok tetramisolu na telázie *in vitro*

Koncentrácia tetramisolu v µg/ml	200	100	50	10	5	1
	smrtiaci účinok v min.					
Invázne larvy	8	17	30	135	240	480
Dospelé červy	9	30	60	120	240	480

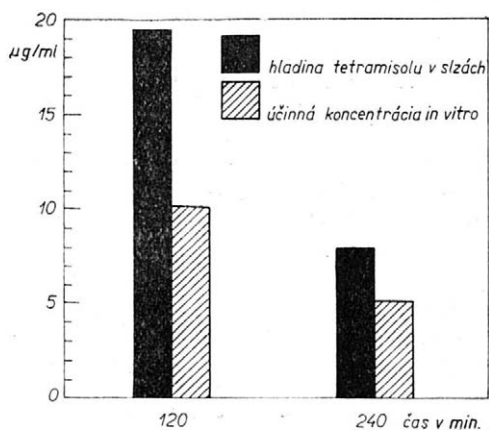
II. Hladiny tetramisolu v slzách hovädzieho dobytká po podaní 15 mg/kg *per os*

Čas od podania v min.	Koncentrácia tetramisolu v slzách v µg/ml
30	3,8
60	9,4
120	$17,5 \pm 2,0$
240	$7,5 \pm 0,4$

DISKUSIA

Tetramisol vyskúšali v pokusoch *in vitro* Van den Bosche a Janssen (1967) na nematódoch *Heterakis spp.*, *Ascaridia spp.*, *Trichocephalus spp.*, *Chabertia spp.*, *Nematospirides spp.*, *Bunostomum spp.*, *Trichostrongylus spp.* a zistili jeho výrazný paralyzujúci účinok už za niekoľko minút kontaktu i v nízkych koncentráciách. Pri skúmaní mechanizmu účinku tejto látky na škrkavkách zistili, že tetramisol účinkuje ako špecifický inhibitor sukcinát-

dehydrogenázy vo svalovine škrkaviek v pokusoch *in vitro* aj *in vivo*, čím zapríčiňuje sekundárnu paralýzu svaloviny škrkaviek a ich nasledovné vypudenie z organizmu hostiteľa. Tento predpoklad potvrdili v ďalších pokusoch, kde S-izomér tetramisolu bol najsilnejším inhibítorom sukcinátdehydrogenázy a zároveň mal aj najsilnejší antihelmintický účinok. O skúšaní tetramisolu na telázie sme v prístupnej literatúre nenašli zmienku, čo nás viedlo k jeho preskúšaniu pri tejto helmintóze, a to tak *in vivo* ako *in vitro*. Pokusy *in vitro* majú najväčšiu hodnotu pre prípadné ďalšie skúšanie látok *in vivo* vtedy, keď sa vytvoria podmienky, ktoré sa čo najviac približujú prirodzeným životným podmienkam, v ktorých parazitické červy žijú (Leiper 1963). Preto predpokladáme, že *in vitro* skúšky s *Thelazia rhodesi* majú svoje opodstatnenie, lebo spojivkový vak, ktorý je ich životným prostredím, im poskytuje podobné životné



1. Porovnanie účinných koncentrácií *in vitro* s vylučovanými hladinami tetramisolu do slz

podmienky, aké sme im vytvorili my použitím nášho kultivačného média (pH, teplota, hustota a obsah lyzozýmu). Porovnaním účinných koncentrácií *in vitro* s vylučovanými hladinami tetramisolu do slz sme zistili, že pri 2hod. expozícii bola účinná koncentrácia *in vitro* (10 µg/ml) takmer dvojnásobne nižšia ako hladina tetramisolu v slzách (17,5+2,0 µg/ml). Aj pri 4hod. expozícii bola smrteľne účinná koncentrácia *in vitro* (5 µg/ml) nižšia ako hladina tetramisolu v slzách (7,5 µg/ml). Predpokladáme, že slzný aparát má zvláštnu schopnosť koncentrovať tetramisol z krvi, lebo jeho hladina v rovnakom čase od podania látky zvieratu je v slzách 10 až 17krát vyššia ako v krvi (Holbrook, Scates 1967).

Na základe úspešných klinických pokusov predpokladáme, že koncentrácia tetramisolu v rozpätí od druhej do štvrtej hodiny od aplikácie je dostatočujúca na irreverzibilný účinok na parazity lokalizujúce sa v spojivkovom vaku.

Korelácia medzi účinkami antihelmintík v pokusoch *in vitro* a *in vivo*, ako sa nám javila v našich pokusoch s tetramisolom, nie je veľmi častá. Leiper (1963) uvádza, že *in vitro* účinné antihelmintiká majú väčšinou vermucidny účinok. Oelkers (1951) zistil, že niektoré antimónové zlúčeniny nie sú účinné na izolované helminty, ale krv odobratá zvieratám liečeným týmito látkami je už pre tie isté červy toxická. Z toho vyplýva, že niektoré účinné látky vznikajú až po biotransformácii v hostiteľskom organizme, a preto účinnosť pôvodne aplikovaných látok sa pokusmi *in vitro* nedá dokázať. Na druhej strane Broome (1961) zistil, že účinná koncentrácia methyridínu pri rovnakom pH prostredia je v pokusoch *in vitro* aj *in vivo* rovnaká. Na základe našich výsledkov sme zistili, že nie sú významné rozdiely v účinnosti tetramisolu podanom jednorázovo a opakovane v 24hod. intervale, čo má hlavne ekonomický význam pri prípadnom hromadnom podávaní tohto antihelmintika. Predpokladáme, že tetramisol pre svoj dobrý antihelmintický účinok a jednoduchú aplikáciu nájde dobré uplatnenie pri klinicky výrazných formách vermínóznej keratokonjunktivitídy hovädzieho dobytku.

Literatura

- BROOME A. W., 1961, Studies on the mode of action of methyridine. Brit. J. Pharmacol. 17 : 327-338.
- ČORBA J., LEŠTAN P., 1969, Príspevok k *in vitro* kultivácii očných helmintov. Biológia: (v tlači).
- HOLBROOK A., SCALES B., 1967, Polarographic Determination of Tetramisole Hydrochloride in Extracts of Animal Tissue. Analyt. Biochemistry 18 : 46-53.
- HOVORKA J., 1959, Príspevok k štúdiu sezónnosti telaziózy hovädzieho dobytku v ČSR. Fol. vet. Cassoviensis, 3/1-2 : 237-249.
- HOVORKA J., 1963, Helminty a helmintohostiteľské vzťahy. Vydavateľstvo SAV, Bratislava : 400-421.
- LEIPER J., 1963, The evaluation of potential anthelmintics by *in vitro* techniques. The evaluation of anthelmintics, Hanover : 14-15.
- OELKERS H. A., 1951, Zur Pharmakologie einiger neuerer Anthelminthica. Ärz. Forsch. : 2-4.
- THIENPONT D. a kol., 1966, Tetramisole (R 8299) a new potent broad spectrum anthelmintic. Nature 209 : 1084-1086.
- TRETJAKOVOVÁ O. N., 1965, K metodike postmortalnej diagnostiky telaziózy крупного rogatého skota i lošadej. Materialy k naučnej konferenciji VOG, III : 269-270.
- VAN den BOSHE H., JANSSEN P., 1967, The biochemical mechanism of action of the anthelmintic drug tetramisole. Life Sciences, 6 : 1787-1792.

Došlo dňa 6. 6. 1969

ЧОРБА Й. (Гельминтологический институт САН. Кошице, Чехословакия). Воздействие тетрализолла на офтальмогельминты крупного рогатого скота *Thelazia rhodesi* (Desmarest 1827). Vet. Мед. (Прага) 14 (11) : 601-606, 1969.

Р работе описаны результаты испытания тетрализолла (Производитель ICI, Мэцлесфилд, Англия) (2, 3, 5, 6-тетра-гидро-6-фенилимидазо/1, 1, 6 тиазол/гидрохлорид) на глазные гельминты *Thelazia rhodesi* в опытах *in vitro* и *in vivo*. Уровень тетрализолла в слезах, после применения терапевтической дозы 15 мг/кг через рот в интервалах от двух до четырех часов после применения был достоверно выше, чем необратимо действующая концентрация тетрализолла *in vitro* при тех же интервалах. При опытах, проводимых на животных, естественно пораженных гельминтами *Thelazia rhodesi*, подтвердилось предполагаемое хорошее воздействие этого антигельминтика и одновременно была доказана корреляция между воздействием тетрализолла *in vitro* и *in vivo*.

Thelazia rhodesi (Desmarest 1827); тетрализол; *in vitro*; *in vivo*; полярографический метод; инвазионные личинки; обратимые; необратимые; сукцинатдегидрогеназ; корреляция

ČORBA J. (Helminthological Institute of the Slovak Academy of Sciences, Košice, Czechoslovakia). The Effect of Tetramisol on the Ophthalmohelminths of Cattle, *Thelazia rhodesi* (Desmarest 1827). Vet. Met. (Praha) 14 (11) : 601-606, 1969.

In this paper the author submits the results obtained in a testing of tetramisol (Producer: ICI, Macclesfield, England) (2, 3, 5, 6-tetrahydro-6-phenyl-imidasol/1, 1, 6 thiasol/hydrochloride) on the ophthalmic worms *Thelazia rhodesi* by means of testst carried cut *in vitro* and *in vivo*. The levels of tetramisol in the tears after application of a therapeutic dose of 15 mg per kg *per os* in intervals from the second to the fourth hour after application were significantly higher than were the irreversible effective concentrations of tetramisol *in vitro* in the same intervals. In experiments carried out with animals naturally invaded by the worms *Thelazia rhodesi* the assumed positive effectiveness of this anthelmintic was confirmed, and at the same time also a correlation between the effects of tetramisol *in vitro* and *in vivo* was proved.

Thelazia rhodesi (Desmarest 1827); tetramisol; *in vitro*; *in vivo*; the polarographic method; invasion of larvae; reversibility; irreversibility; succinate dehydrogenase; correlation

ČORBA J. (Helminthologisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Košice, Tschechoslowakei). *Wirkung des Tetramisols auf die Ophthalmelminthen Thelazia rhodesi* (Desmarest 1827). Vet. Med. (Praha) 14 (11): 601-606, 1969.

Die vorliegende Arbeit faßt die Ergebnisse von Untersuchungen über die Wirkung des Tetramisols (Erzeuger ICI, Macclesfield, England) (2, 3, 5, 6-Tetrahydro-6-Phenyl-Imidazol/1, 1, 6 Thiazol/Hydrochlorid/) auf die Augenwürmer *Thelazia rhodesi* *in vitro* und *in vivo* zusammen. Die Tetramisolspiegel in Tränen nach Applikation der therapeutischen Dosis 15 mg/kg *per os* in Intervallen von zwei bis vier Stunden nach der Verabreichung waren signifikant höher als die irreversiblen wirksamen Tetramisolkonzentrationen *in vitro* in gleichen Intervallen. In Versuchen mit natürlich von Würmern *Thelazia rhodesi* invadierten Tieren bestätigte sich die vorausgesetzte gute Wirksamkeit dieses Anthelminthikums und gleichzeitig wurde eine korrelative Beziehung zwischen der Termisolwirkung *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen.

Thelazia rhodesi (Desmarest 1827); Tetramisol; *in vitro*; *in vivo*; polarographische Methode; Invasionslarven; reversibel, irreversibel; Sukzinatdehydrogenase; Korrelation

Adresa autora:

MVDr. J. Čorba, CSc., SAV, Helminthologický ústav, Košice, Dukelských hrdinov 11
Vedúci: Akademik Ján Hovorka

ANTHELMINTICKÁ AKTIVITA VÝVOJOVÝCH CHEMICKÝCH LÁTEK ZJIŠTOVANÁ NA MODELOVÉM PARAZITU *Nippostrongylus braziliensis*

J. Daněk, B. Ševčík

Výzkumné středisko pro veterinární léčiva Spofa, Pohoří-Chotouň

DANĚK J., ŠEVČÍK B. Anthelmintická aktivita vývojových chemických látek zjišťovaná na modelovém parazitu *Nippostrongylus braziliensis*. Vet. Med. (Praha) 14 (11): 607-615, 1969.

Jsou popsány výsledky čtyř modelových anthelmintických screeningů, ve kterých bylo otestováno 40 látek připravených ve Výzkumném ústavu pro farmacii a biochemii v Praze. Převážnou většinu tvořily vyšší alifatické aminy a jejich deriváty (19 látek), deriváty kyseliny chinoxalinkarbonové (6 látek) a deriváty pyrimidinu (4 látky). Látky jsme testovali v modelovém pokuse na *Nippostrongylus braziliensis* a aplikovali krysám kmene Wistar jednorázově *per os* v dávce 200 mg/kg ž. v. Z testovaných látek vykazovalo 9 látek 20% až 39% účinnost. U zbývajících jsme zjišťovali nižší až nulovou účinnost na uvedeného modelového parazita.

modelový screening a modelový parazit; testace; vyšší alifatické aminy; deriváty kyseliny chinoxalinkarbonové; deriváty pyrimidinu; *Nippostrongylus braziliensis*

Vývoj nových látek s antihelmintickou účinností, zaměřenou převážně proti oblému červu přežvýkavců, zůstává stále důležitou náplní zahraničního i našeho farmaceutického průmyslu.

Počet nemocných zvířat, a hlavně ztráty způsobené parazitózami u hospodářských zvířat, jsou i dnes velmi vysoké a zasluhují si stále větší pozornosti. V našich podmínkách zaujímají právě gastroenterohelmintózy přežvýkavců třetí místo v pořadí nejčastěji zjišťovaných nebezpečných parazitóz. Aktuálnost tlumení parazitóz domácích zvířat vystupuje do popředí v současné době, kdy nabývá charakteru celostátní úlohy (B r e z a 1967).

Z tohoto důvodu se také na našem pracovišti věnujeme testaci nově vyvíjených látek. Při testaci látek v modelovém pokuse pracujeme s nematodem *Nippostrongylus braziliensis*. V předcházející publikaci (Š e v č í k, D a n ě k 1968) jsme popsali anthelmintické účinky prvních 39 testovaných látek (screening č. 1 až 4).

V tomto článku popisujeme účinnost dalších 40 látek (screening č. 5 až 8), které jsme otestovali ve čtyřech modelových pokusech na stejném modelovém parazitu. Syntézu těchto screenovaných látek provedlo oddělení chemické syntézy Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii v Praze pod vedením dr. ing. Z. Buděšínského, DrSc., a dr. Weicheta.

MATERIÁL A METODIKA

Při testaci látek s anthelmintickým účinkem pracujeme metodou podle Standena (1963). Metodický postup modelového screeningu na našem pracovišti popsal Daněš (1968). Způsob testace látek popsali Ševčík a Daněš (1968). Pro úplnost uvádíme jen schéma screeningu.

V primárním modelovém pokuse testujeme vždy 10 látek. Každou testovanou látku jsme aplikovali *per os* 6 pokusným krysám v dávce 200 mg/kg ž. v. Stáří krys zařazených do pokusu se pohybuje kolem 45 až 50 dnů, což odpovídá zhruba váze 115 až 130 g. Každý modelový screening trvá 12 dnů. Na počátku pokusu jsme krysám samčího pohlaví invadovali 500 larev *Nippostrongylus braziliensis* s. c. do hřbetní krajiny. Objem invazního materiálu na jedno místo nepřesahoval 0,2 ml. Šestý den jsme kontrolovali invazi pomocí EPG (počet vajíček v jednom gramu trusu). Testované látky jsme aplikovali krysám *per os* 8. den po invazi (nejvyšší objem látky na jednu krysou se pohyboval mezi 0,96–1,0 ml). Látky nerozpustné ve vodě jsme homogenizovali v Dorfmanově činidle. Modelový screening jsme zakončili 12. den zabitím krysy a vyhodnotili spočítáním celkového množství červů v zažívacím traktu každé krysy. Standardní skupinu tvořily krysy, kterým jsme aplikovali Thiabendazol fy Merck v dávce 50 mg/kg ž. v., vedle toho jsme do každého screeningu zařadili neléčenou invadovanou kontrolní skupinu. Každý modelový screening jsme vyhodnotili analýzou rozptylu a pokud byly rozdíly mezi zjištěným počtem červů v jednotlivých skupinách statisticky významné na 5% hladině významnosti, doplnili jsme výsledky analýzy rozptylu výpočtem Duncanova testu. Statistické hodnocení bylo provedeno v Ústavu hygieny práce v Praze.

V uvedených čtyřech modelových screenincích jsme testovali především látky ze skupiny vyšších alifatických aminů, dále deriváty kyseliny chinoxalin-karbonové a deriváty pyrimidinu. Deriváty ostatních chemických skupin byly zastoupeny v malém měřítku.

VÝSLEDKY

Výsledky anthelmintických modelových screeningů č. 5 až 8 a statistického hodnocení jsou popsány v tabulkách I, II, III a IV.

DISKUSE

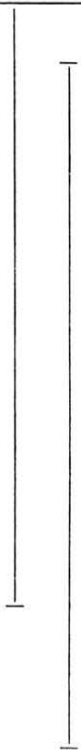
Výhody, ale zároveň i nevýhody testace látek v primárním modelovém screeningu jsme již popsali v předcházející práci (Ševčík, Daněš 1968). Při vyhodnocování účinnosti testovaných látek si musíme uvědomit především systematické a fylogenetické zařazení modelového červa *Nippostrongylus braziliensis*. V našem případě lze proto předpokládat především účinek na gastroenteronematody přezvýkavců z čeledi *Trichostrongylidae*, se kterou je *Nippostrongylus braziliensis* fylogeneticky velmi úzce příbuzný.

V popsáných pokusech nedosahovala ani jedna látka 50% účinnosti. Z hlediska chemického vývoje a syntézy zůstávají zajímavé především látky VÚFB 7491 = 2-N-cyklohexylaminotridekan HCl-37,5 %, VÚFB 8091 = 2-chloracetaminotridekan-21,6 % a VÚFB 8092 = 2-N-(beta-chloretyl) aminotridekan HCl-22,6 % ze 6. screeningu, dále látky VÚFB 7476 = 2-N-dimethylaminoheptadekan HCl-29,7 %, VÚFB 7478 = 2-aminotridekan-2-hydroxy-3-naftoát – 34,0 % a VÚFB 8097 = 1-(2-tridecyl)biguanid HCl – 39,0 % ze 7. screeningu a látky

I. Výsledky modelového screeningu č. 5

Skupina	Počet zvířat ve skupině	Látka	Ø počet červů u 1 krysy na konci pokusu	Dolní a horní mez spolehlivosti	Účinnost látky v % k negativní kontrolě	Významnost
K	6	2-chlor-4-nitrofenol	289,8	235,4 – 349,8	0	
N	6	etanolamid kys. undecylenové	286,6	232,6 – 346,3	0	
M	6	p-benzyl-fenylkarbamát	262,4	210,8 – 319,6	0	
G	6	N-N-bis (2-tridecyl)amin HCl	258,0	206,9 – 314,8	0	
C	6	2-aminopentadekan × p-hydroxybenzoát	245,3	195,6 – 300,8	0	
A	6	kontrola	226,3	178,5 – 279,6	—	
F	6	2-N-butylaminoheptadekan HCl	216,3	169,7 – 268,6	4,5	
H	6	2-heptadecylisothiokyanát	206,1	160,7 – 257,2	9,4	
D	6	p-chlorfenoxyacetyl-N-dodecyla- min	198,6	154,1 – 248,8	11,6	
E	6	2-aminotetradekan hydrochlorid	196,2	151,9 – 246,1	12,8	
O	6	2-N(1,5-dimethylhexyl)aminotri- dekan hydrochlorid	179,1	136,9 – 226,9	19,2	
B	6	Thiabendazol	0,2	0 – 4,3	99,8	

II. Výsledky modelového screeningu č. 6

Skupina	Počet zvířat ve skupině	Látka	Ø počet červů u 1 krysy na konci pokusu	Dolní a horní mez spolehlivosti	Účinnost látky v % k negativní kontrolě	Významnost
H	6	2-dichloracetamidoheptadekan	423,7	323,5 – 537,4	0	
G	6	2-dichloracetamidotridekan	384,2	289,1 – 492,8	0	
C	6	2-karboxy-3-metyl-5-fluorvale- rová kyselina	345,7	255,8 – 449,1	0	
A	6	kontrola	343,0	253,5 – 445,9	—	
E	6	2-N/1-metylheptyl/aminotri- dekan HCl	340,2	251,1 – 442,8	0,3	
D	6	thiosemikarbazon metylundecyl- ketonu	327,2	240,0 – 428,0	5,0	
K	6	2-decyl-3-hydroxy-butyltrime- tyl-amonium jodid	322,2	235,7 – 422,2	5,3	
M	6	dimethylamino-2-decyl-3-hydro- xybutan hydrochlorid	283,1	202,4 – 377,2	16,1	
N	6	2-chloracetamidotridekan	254,2	178,1 – 343,7	21,7	
O	6	2-N-/β-chloretyl/aminotridekan HCl	253,1	177,2 – 342,5	22,7	
F	6	2-N-cyklohexylaminotridekan HCl	181,8	118,5 – 258,6	37,6	
B	6	Thiabendazol	3,6	0 20,1	98,0	

III. Výsledky modelového screeningu č. 7

Skupina	Počet zvířat ve skupině	Látka	Ø počet červů u 1 krysy na konci pokusu	Dolní a horní mez spolehlivosti	Účinnost látky v % k negativní kontrolě	Významnost
M	6	1,2-dibenzoxy-4-nitrobenzen	440,5	365,7 – 522,3	0	
C	6	etyléster kys. 4-hydroxy-6/7/-n-butoxy-7/6/-β-metoetoxy-3-chinolin-karbonové	430,7	356,7 – 511,5	0	
A	6	kontrola	421,8	348,7 – 501,9	—	
H	6	bis-/5-β-metoxyetoxy-2-pyrimidinyl/-disulfid	407,3	335,5 – 486,1	2,6	
D	6	etyléster kys. 6,7-bis-/β-metoxyetoxy/-2-hydroxy-3-chinoxalin-karbonové	397,6	326,7 – 475,5	5,5	
K	6	6,7-di-n-butoxy-2-hydroxy-3-chinoxalinyloctan etylnatý	383,6	313,6 – 459,6	8,9	
F	6	2-aminotridekan undecylenát	381,5	312,2 – 457,9	9,3	
N	6	N-/2-metyl-4-amino-5-pyrimidinyl-metyl/-karbamát etylnatý	335,8	270,9 – 407,6	20,0	
E	6	2-N-dimetylaminoheptadekan HCl	287,7	221,7 – 346,7	29,7	
G	6	2-aminotridekan-2-hydroxy-3-naftoát	272,9	214,7 – 338,0	34,1	
O	6	1-/2-tridecyl/biguanid HCl	252,2	196,4 – 314,9	39,1	
B	6	Thiabendazol	31,5	14,0 – 55,9	89,5	

IV. Výsledky modelového screeningu č. 8

Skupina	Počet zvířat ve skupině	Látka	Ø počet červů u 1 krysy na konci pokusu	Dolní a horní mez spolehlivosti	Účinnost látky v % k negativní kontrolě	Významnost
A	6	kontrola	319,1	257,4—387,3	—	
C	6	4-hydroxy-5-fluor-6-fluormetyl- pyrimidin	311,8	250,9—379,3	0	
D	6	etyléster kys. 2-hydroxy-6/7/- metoxy-7/6/-/β-metoxyetoxy/-3- chinoxalinkarbonové	298,5	238,9—364,7	6,0	
M	6	hydrobromid etylesteru 2-tri- decylglycinu	289,3	230,8—354,5	9,2	
F	6	etyléster kys. 2-amino-4-hydro- xy-5-pyrimidininkarbonové	280,2	222,6—344,3	12,4	
G	6	hydrazid kys. 2-hydroxy-6,7- dimetoxy-3-chinoxalinkarbonové	261,6	206,1—323,7	18,3	
N	6	2-acetamidotridekan	258,6	203,5—320,4	19,1	
O	6	2-aminotridekan, sůl s 2-mer- kapto-benzthiazolem	257,7	202,6—319,3	19,9	
H	6	hydrazid kys. 6,7-dimetoxy-3- chinoxalinkarbonové	254,5	199,8—315,8	20,9	
K	6	etyléster kys. 2-piperidino-6,7- dimetoxy-3-chinoxalinkarbonové	248,4	194,4—309,0	22,2	
E	6	N-/2-metyl-4-amino-5-pyrimi- dinylnmetyl/-karbaminan etylnatý	230,4	178,6—288,9	24,2	
B	6	Thiabendazol	5,1	0,2— 16,6	97,8	

Statistické hodnocení

Analýza rozptylu:

Anthelmintický screening č. 5

Zdroj měnlivosti	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Podíl	F
Mezi skupinami	1 299,44696	11	118,13154	27,900**
Reziduální	254,04885	60	4,23415	
Celkový	1 553,49581	71		

Anthelmintický screening č. 6

Zdroj měnlivosti	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Podíl	F
Mezi skupinami	1 597,65140	11	145,24104	14,346**
Reziduální	607,47009	60	10,12450	
Celkový	2 205,12149	71		

Anthelmintický screening č. 7

Zdroj měnlivosti	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Podíl	F
Mezi skupinami	1 187,87668	11	107,98879	20,700**
Reziduální	313,00828	60	5,21680	
Celkový	1 500,88496	71		

Anthelmintický screening č. 8

Zdroj měnlivosti	Součet čtverců	Stupeň volnosti	Podíl	F
Mezi skupinami	1 162,00431	11	105,63676	21,307**
Reziduální	297,47436	60	4,95791	
Celkový	1 459,47867	71		

VÚFB 7832 = N-(2-metyl-4-amino-5-pyridinylmetyl)-karbaminan etylnatý — 24,2 %, VÚFB 7868 = hydrazid kyseliny 6,7-dimetoxy-3-chinoxalinkarbonové — 20,9 % a VÚFB 7869 = etylester kyseliny 2-piperidino-6,7-dimetoxy-3-chinoxalinkarbonové s účinností 22,2 %. Nižší účinnost Thiabendazolu ve 3. screeningu si vysvětlujeme biologicky méně hodnotným pokusným materiálem, který se projevil až v konečné fázi pokusu.

Při testaci nových látek je třeba současně věnovat pozornost šíři spektra účinnosti těchto látek na další modelové červy. Z našeho hlediska se jedná především o zavedení modelového screeningu s tasemnicí *Hymenolepis nana*, metodicky popsaného v pracích Sinha P. Devi a Hopkinse (1967) a Berntzena (1962). Dále považujeme za nutnou testaci na zástupcích čeledi *Oxyuridae*, např. *Syphacia obvelata* nebo *Syphacia muris* a proti *Aspicularis tetraptera* (Sheffield a kol. 1959, Hsieh Kuo, Yeng Ngh 1952 a Baker 1963). Dosti opomíjenou oblastí zůstávají právě v modelovém testování parazitózy drůbeže. V blízké budoucnosti chceme proto rozšířit modelové parazity i o nematoda *Heterakis gallinae*.

Dále testujeme látky, které vykazovaly více než 20% účinnost, také ve spolupráci s Helminnologickým ústavem SAV v Košicích, a to na *Nematospiroides dubius* a *Trichinella spiralis* (střevní stadium). Tyto práce se konají v laboratoři, kterou vede dr. R. Špaldonová, CSC.

Literatura

- BAKER N. F., 1963, The Evaluation of anthelmintics for nematodes using *in vivo* tests in small laboratory animals. Proc. of the first International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology: 18-26.
- BERNTZEN A. K., 1962, J. Parasitology 48 : 785 — cit. SINHA P. DEVI, HOPKINS C. A., 1967, *In vitro* Cultivation of the Tapeworm *Hymenolepis nana* from Larva to Adult. Nature 215 : 1275-1276.
- BREZA M., 1967, Niekoľko poznámok k tlmeniu gastrointestinálnych pasienkových strongylátóz prežúvavcov. Veterinárství XVII : 397-401.
- DANĚK J., 1968, Testace látek na anthelmintický účinek v modelových pokusech. Veterinárství XVIII : 166-168.
- HSIEH KUO, YENG NGEH, 1952, The effect of the standard pinworm chemotherapeutic agents on the mouse pinworm *Aspicularis tetraptera*. Am. J. Hygieny 56 : 287-293.
- SHEFFIELD H. G., MEISENHOLDER J. E., THOMPSON P. E., 1959, The effects of reference anthelmintics against *Nematospiroides dubius* and oxyurids in mice relative to screening procedures for new drugs. J. Parasitology 45 : 653-662.
- SINHA P. DEVI, HOPKINS C. A., 1967, *In vitro* Cultivation of the Tapeworm *Hymenolepis nana* from Larva to Adult. Nature 215 : 1275-1276.
- STANDEN O. D., 1963, Chemotherapy of helminthic infections. In: Experimental Chemotherapy, Vol. I (R. J. Schnitzer and F. Hawking, ed.), Academic Press, New York and London: 701-892.
- ŠEVČÍK B., DANĚK J., 1968, Zjišťování anthelmintické aktivity vývojových chemických látek ve screeningu na *Nippostrongylus braziliensis*. Vet. Med. (Praha) 13 (11-12) : 625-632.

Došlo dne 23. 4. 1969

ДАНЕК Й., ШЕВЧИК Б. (Научно-исследовательский центр ветеринарных медикаментов Спота, Погоржи - Хотоунь, Чехословакия). Антигельминтическая активность опытных химикатов, определяемая на модельных паразитах *Nippostrongylus braziliensis*. Вет. Мед. (Прага) 14 (11) : 607-615, 1969.

В работе описаны результаты четырех модельных антигельминтических классификаций, при которых тестировалось 40 химикатов, приготовленных в Научно-исследовательском

институте фармакологии и биохимии в Праге. Большинство из них составляли высшие алифатические амины и их дериваты (19 химикатов), дериваты хиноксалинкарбоновой кислоты (6 химикатов) и дериваты пиримидина (4 химиката). Химикаты тестировали в модельном опыте с *Nippostrongylus braziliensis* и применяли на крысах семи *per os* одноразового в дозе 200 мг/кг живого веса. Из тестированных химикатов 9 оказывало 20 %—39 % воздействие. У остальных химикатов мы определили пониженное, почти нулевое воздействие на упомянутый модельный паразит.

модельная классификация и модельный паразит; тестирование; высшие алифатические амины; дериват хиноксалинкарбоновой кислоты; дериваты пиримидина; *Nippostrongylus braziliensis*

DANĚK J., ŠEVČÍK B. (Research Centre of Veterinary Medicaments, SPOFA, Pohoří—Chotouň, Czechoslovakia). *The Anthelmintic Effect of Developmental Chemical Compounds Investigated in the Model Parasite Nippostrongylus braziliensis*. Vet. Med. (Praha) 14 (11) : 607-615, 1969.

There is a description of the results obtained in four model anthelmintic screenings, in which 40 substances prepared at the Research Institute of Pharmacology and Biochemistry in Prague were tested. A predominant majority were higher aliphatic amines and their derivatives (19 compounds), derivatives of quinoxalincarbonic acid (6 compounds), and derivatives of pyrimidine (4 compounds). The compounds were tested in a model experiment in *Nippostrongylus braziliensis* and applied to rats of the Wistar strain *per os* in single doses of 200 mg per 1 kg of body weight. Of the tested compounds 9 showed an effect of from 20 to 39 per cent. In the other compounds we found a from lower to zero effect on the mentioned model parasite.

model screening and model parasite; testing; higher aliphatic amines; derivative of quinoxalincarbonic acid; derivatives of pyrimidine; *Nippostrongylus braziliensis*

DANĚK J., ŠEVČÍK B. (Forschungsstelle für Veterinärmedikamente SPOFA, Pohoří—Chotouň, Tschechoslowakei). *Anthelminthika-Aktivität chemischer Entwicklungstoffe, welche auf dem Modellparasit Nippostrongylus braziliensis festgestellt wird*. Vet. Med. (Praha) 14 (11) : 607-615, 1969.

Es werden die Resultate von vier anthelminthischen Screenings beschrieben, bei welchen 40 im Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie in Praha vorbereitete Stoffe getestet wurden. Es handelte sich überwiegend um höhere aliphatische Amine und deren Derivate (19 Stoffe), Derivate der Chinoxalinkarbonsäure (6 Stoffe) und Pyrimidinderivate (4 Stoffe). Die Stoffe wurden in einem Modellversuch mit *Nippostrongylus braziliensis* getestet und an Ratten des Wistar-Stammes in Gaben von 200 mg/kg Lebendmasse einmalig *per os* verabreicht. Von den geprüften Stoffen zeigten 9 Stoffe eine 20—30 % Wirkung. Bei den übrigen Stoffen wurde eine geringere, bzw. keine Wirkung festgestellt.

Modellscreening und Modellparasit; Test; höhere aliphatische Amine; Derivat der Chinoxalinkarbonsäure; Pyrimidinderivate; *Nippostrongylus braziliensis*

Adresa autorů:

MVDr. Jaroslav Daněk, MVDr. Bohumil Ševčík, CSc., Výzkumné středisko pro veterinární léčiva Spofa, Pohoří—Chotouň

HLADINY CHLORAMFENIKOLU V KREVNÍM SÉRU TELAT, PRASAT A KONÍ PO I. M. APLIKACI INJEKČNÍHO ROZTOKU

B. Ševčík, M. Dvořák, K. Plíšek

Výzkumné středisko pro veterinární léčiva Spofa, Pohoří-Chotouň

ŠEVČÍK B., DVORÁK M., PLÍŠEK K. *Hladiny chloramfenikolu v krevním séru telat, prasat a koní po i. m. aplikaci injekčního roztoku.* Vet. Med. (Praha) 14 (11): 617-623, 1969.

Ve čtyřech dílčích pokusech jsme sledovali hladiny chloramfenikolu v krevním séru telat, selat, prasat a koní po odstupňovaných dávkách 15% roztoku D-chloramfenikolu v propylenglykolu s 1% přísadou Mesocainu. Preparát jsme aplikovali jednorázově intramuskulárně. Nejvyšší hladiny — 3,66 a 3,3 µg/ml jsme zjistili u telat za jednu a za tři hodiny po aplikaci dávky 10 mg/kg ž. v., u prasat 1,53 µg/ml po dávce 20 mg/kg ž. v. a u selat 2,17 µg/ml po dávce 30 mg/kg ž. v., v obou případech za tři hodiny po aplikaci. U koní bylo dosaženo nejvyšší hladiny 1,05 µg/ml za šest hodin po aplikaci dávky 12 mg/kg ž. v. Hladiny antibiotik v krevním séru zvířat klesaly pozvolna a za 24 hod. po aplikaci byla zjišťovaná množství chloramfenikolu přes 0,2 µg/ml. U většiny zvířat nebyly pozorovány po aplikaci preparátu lokální ani celkové reakce.

D-chloramfenikol; 15% injekční roztok; sérové hladiny

Mezi prvořadé úkoly farmaceutického průmyslu patří zajištění širokospektrých antibiotik nebo jejich kombinace ve stabilizovaných injekčních lékových formách, vhodných pro veterinární praxi. Pro tyto účely je v současné době vyráběn u nás jediný veterinární přípravek „Oxymykoín Spofa p. u. v.“, zavedený do výroby v minulém roce. Na nutnost vývoje a výroby antibiotických veterinárních injekčních preparátů v našich podmínkách jsme již několikrát poukázali (Ševčík a kol. 1968, 1969). V současné době dokončujeme ve Výzkumném středisku pro veterinární léčiva Spofa ve spolupráci s n. p. Léčiva vývoj stabilizované injekční formy chloramfenikolu v propylenglykolu. Obdobné přípravky jsou v zahraničí běžně vyráběny — např. Animycetin (Stevenson, Turner and Boyce Ltd., Reading), Erbacetina (Carlo Erba, Milano), Farmicetina (Farmitalia S. A., Milano), Leukomycin Lösung (Bayer Leverkusen), Rogar-Mycine (Rogal Ltd., Toronto), Ursophenicol (VEB Serum-Werk Bernburg), V-Cortanmycetine inject. (Lab. Roussel, Paris), (Martínek 1966).

Velmi široké antimikrobiální spektrum chloramfenikolu, které zahrnuje gramnegativní i grampozitivní bakterie a koky, dále spirochéty, aktinomycety, rickettsie i některé velké viry, vytváří rozsáhlou indikační oblast pro používání tohoto antibiotika ve veterinární terapii. Rezistence na chloramfenikol se vyvíjí poměrně pomalu, zkříženou rezistenci jeví prakticky jen s tetracyklinovými antibiotiky, a to pouze u gramnegativních bakterií (Modr kol. 1964). Kono a kol. (1968) popsal rezistentní kmeny stafylokoků, které jsou schopné inhibovat chloramfenikol. Hladiny v krevním séru po perorální aplikaci jsou vyšší

a rychle klesají, zatímco po parenterální *i. m.* aplikaci je dosahováno nižších, avšak protrahovanějších hladin (R i m á r o v á 1966). Většina chloramfenikolu se vylučuje ledvinami (M o d r a kol. 1964), kde jsou zjišťovány vysoké koncentrace (Š m a h e l a kol. 1967). Z vedlejších účinků jsou popsány především krevní dyskrasie (M o d r a kol. 1964, B e s t 1967). Hladiny po různých aplikacích u zvířat, dávkování i klinické indikace ve veterinární terapii shrnuje B r u n n e r a kol. (1962).

M A T E R I Á L A M E T O D I K A

Složení 100 ml injekčního roztoku:

D-chloramfenikol subst.	15,0
Mesocain	1,0 g
Propylenglykol	od 100,0 ml

Hladiny chloramfenikolu po jednorázové aplikaci jsme zjišťovali u různých druhů hospodářských zvířat; v tomto sdělení uvádíme dílčí výsledky dosažené u telat, prasat, selat a koní.

Do pokusu č. 1 jsme zastavili 36 telat, plemene čstr., váha 95 až 203 kg. Přípravek jsme aplikovali jednorázově *i. m.* do krku v max. objemu 10 ml na jedno místo, ve třech dávkách 5, 7,5 a 10 mg/kg ž. v. Každou dávku jsme zkoušeli na 12 telatech.

V pokuse č. 2 jsme aplikovali zkoušený preparát ve dvou dávkách 20 a 30 mg/kg ž. v. selatům plemene BU, o váze od 12 do 27 kg. Každou dávku ž. v. prasatům plemene BU, o váze od 64 do 83 kg, v každé skupině osmi kusům. Při jednorázovém podání jsme aplikovali maximálně 11 ml na jedno místo.

V pokuse č. 3 jsme aplikovali přípravek ve třech dávkách 10, 15 a 20 mg/kg ž. v. prasatům plemene BU o váze od 64 do 83 kg, v každé skupině osmi kusům. Při jednorázovém podání jsme aplikovali maximálně 11 ml na jedno místo.

V pokuse č. 4 jsme čtyřem koním ve váze od 480 do 620 kg podali jednorázově preparát v dávce 12 mg/kg ž. v. do krční svaloviny v max. objemu 20 ml na jedno místo a čtyřem koním v dávce 15 mg/kg ž. v. do prsních svalů. Při této dávce jsme aplikovali celý objem na jedno místo.

Hladiny chloramfenikolu jsme sledovali ve všech pokusech za 3, 6, 12 a 24 hodiny po aplikaci, u telat v pokuse č. 1 ještě za 1, 9 a 30 hodin a u koní v pokuse č. 4 též za 30 hodin.

Ke stanovení chloramfenikolu v krevním séru jsme používali kolorimetrickou metodu podle L e v i n e, F i s b a c h (1951), v modifikaci podle ing. Grafnetterové z Výzkumného ústavu experimentální terapie v Praze-Krči.

Současně jsme ve všech pokusech sledovali snášenlivost preparátu v místě vpichu a celkové projevy bolestivosti po aplikaci. Zvířata byla v jednotlivých dílčích pokusech umístěna ve shodných zoohygienických podmínkách.

V Ý S L E D K Y P O K U S Ů

jsou uvedeny na obr. 1 až 4, výsledky pokusu č. 1 též v tabulce I.

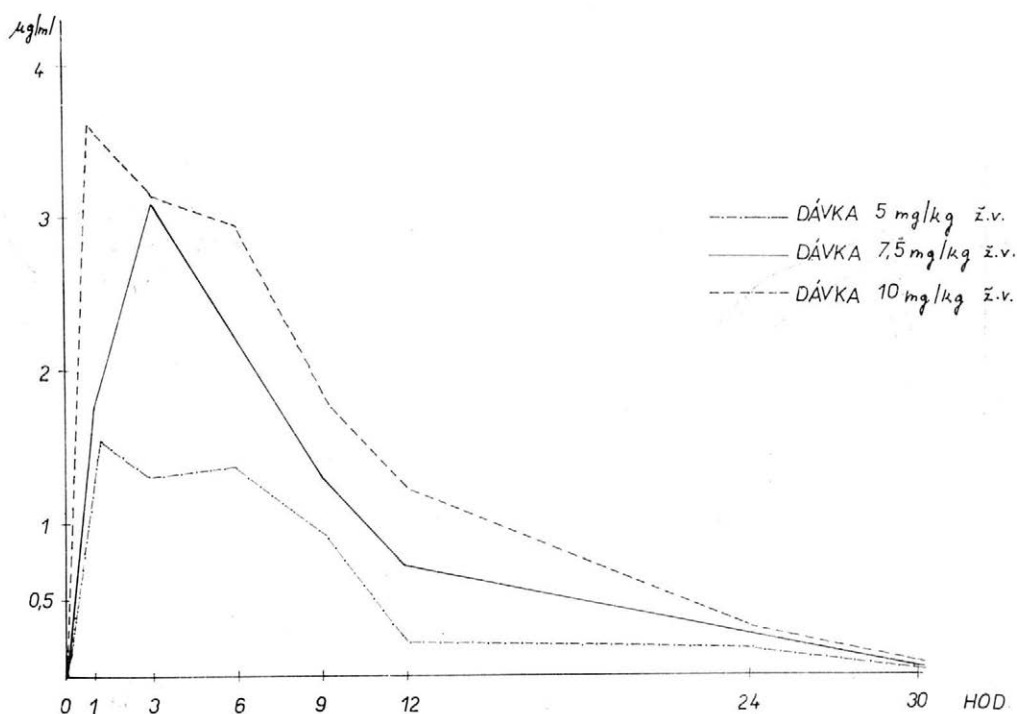
Po podání uvedených dávek jsme pozorovali těsně po aplikaci u tří telat celkový neklid a projevy bolestivosti, u jednoho koně došlo k induraci místa vpichu v prsní krajině. U ostatních zvířat jsme nezjistili celkové ani místní reakce.

DISKUSE

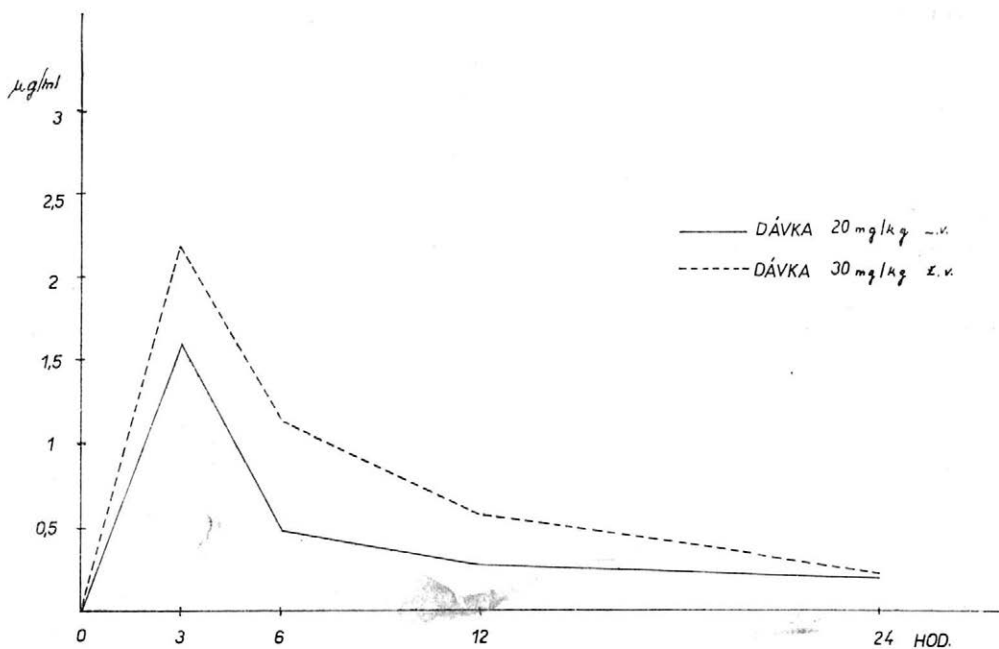
Účinek chloramfenikolu je bakteriostatický, na grampozitivní koky působí ve vyšších koncentracích než na gramnegativní bakterie. Minimální inhibiční koncentrace u citlivých kmenů se pohybují *in vitro* od 0,2 do 1,25 $\mu\text{g/ml}$

I. Hladiny chloramfenikolu v krevním séru telat po jednorázové *i. m.* aplikaci různých dávek

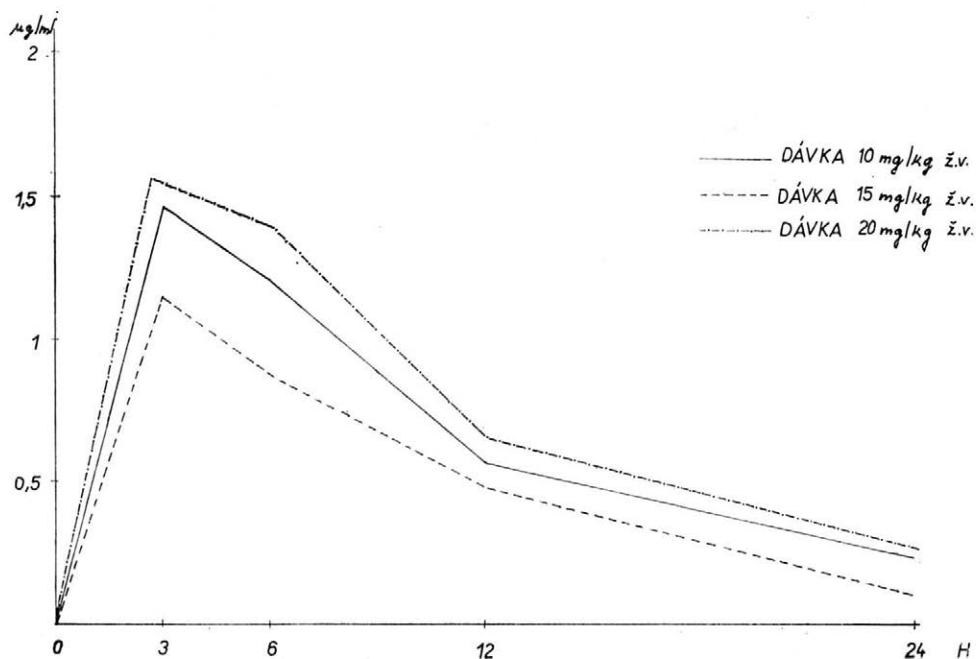
Dávka chloramfenikolu v mg/kg ž. v.	Počet zvířat	Hladiny chloramfenikolu v krevním séru	Hodiny po aplikaci						
			1	3	6	9	12	24	30
5	12	$\bar{x}$ $\mu\text{g/ml}$	1,556	1,320	1,386	0,935	0,254	0,181	0,051
		s $\mu\text{g/ml}$	$\pm 0,696$	$\pm 0,593$	$\pm 0,567$	$\pm 0,422$	$\pm 0,149$	$\pm 0,180$	$\pm 0,040$
7,5	12	$\bar{x}$ $\mu\text{g/ml}$	1,754	3,120	2,265	1,306	0,724	0,215	0,042
		s $\mu\text{g/ml}$	$\pm 1,220$	$\pm 2,320$	$\pm 0,921$	$\pm 0,535$	$\pm 0,391$	$\pm 0,139$	$\pm 0,048$
10	12	$\bar{x}$ $\mu\text{g/ml}$	3,665	3,135	2,977	1,857	1,259	0,247	0,044
		s $\mu\text{g/ml}$	$\pm 3,620$	$\pm 1,670$	$\pm 1,460$	$\pm 1,670$	$\pm 0,646$	$\pm 0,195$	$\pm 0,057$



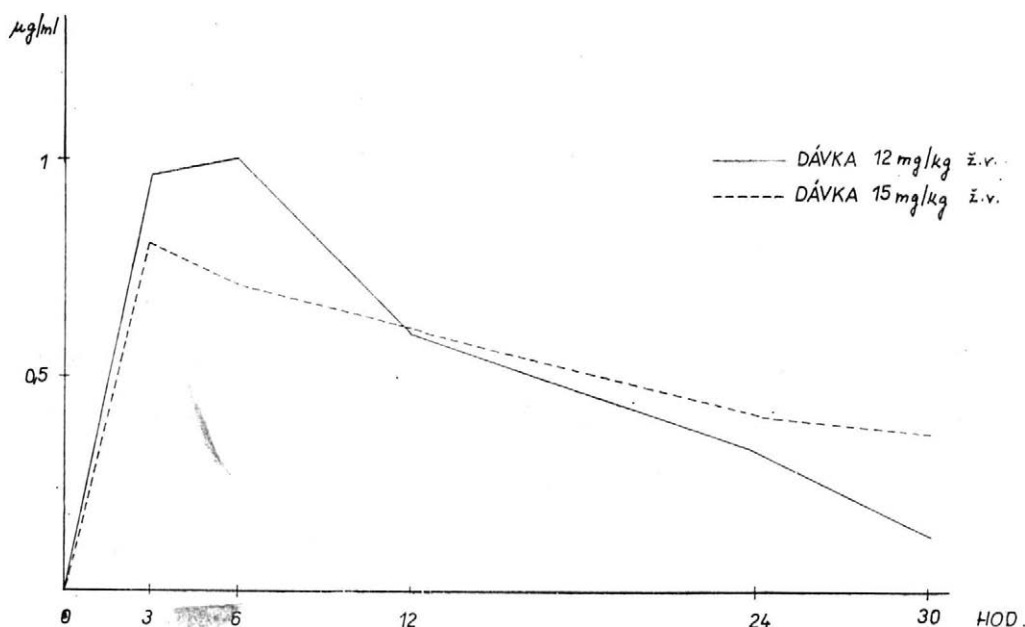
1. Hladiny chloramfenikolu v krevním séru telat po *i. m.* aplikaci



2. Hladiny chloramfenikolu v krevním séru selat po $i.m.$ aplikaci



3. Hladiny chloramfenikolu v krevním séru prasat po $i.m.$ aplikaci



4. Hladiny chloramfenikolu v krevním séru koní po *i. m.* aplikaci

Dávka 12 mg/kg ž. v. byla aplikována do krční svaloviny v max. objemu 20 ml na jedno místo, dávka 15 mg/kg ž. v. byla aplikována do prsních svalů, celý objem na jedno místo

(Modr a kol. 1964). I když střední terapeutické hladiny dosahované v našich pokusech za 3 až 6 hodin po aplikaci jsou podstatně vyšší, přihlíželi jsme při stanovení dávek k hladinám zjišťovaným za 24 hod. po aplikaci. Stanovili jsme takové dávky, po kterých bylo u jednotlivých druhů zvířat dosahováno po jednorázové aplikaci chloramfenikolu v tomto intervalu minimálně 0,2 µg/ml krevního séra. Toto považujeme za velmi důležité z hlediska terénní praxe, při které je možno aplikovat antibiotikum obvykle jednou denně. Z výsledků vyplývá, že nejvyšších a nejvíce protrahovaných hladin bylo dosahováno u telat po dávce 10 mg/kg ž. v., dostatečná byla i dávka 7,5 mg/kg ž. v., u prasat byla vhodná dávka 15 a 20 mg/kg ž. v. U koní bylo dosaženo po dávkách 12 a 15 mg/kg ž. v. nízkých počátečních hladin za tři a šest hodin po aplikaci, tyto hladiny však jen velmi pozvolna klesaly. V tomto pokuse se výrazně projevila i vliv různého způsobu aplikace. Při injikování celé dávky na jedno místo došlo jen k velmi pozvolnému vstřebávání a bylo tak dosaženo nižších hladin po vyšší dávce 15 mg/kg ž. v. proti dávce 12 mg/kg ž. v. aplikované *i. m.* na více míst. Také Brunner (1962) uvádí u koní po *i. m.* aplikaci nízké zjišťované hladiny antibiotika v krevním séru. Námi doporučované denní terapeutické dávky pro velká zvířata 8 až 12 mg/kg ž. v., pro střední 12 až 15 mg/kg ž. v. a pro malá zvířata 20 až 50 mg/kg ž. v. jsou poněkud vyšší než uvádějí po *i. m.* aplikaci např. Meyer a Jones (1957) (cit. Brunner a kol. 1962). Ve shodě s Rimárovou (1966) je třeba konstatovat, že po intramuskulární parenterální aplikaci chloramfenikolu se projevuje zpomalená resorbce a pomalu klesající křivka sérových hladin. Propylenglykol zvyšuje depotnost účinku, což je z hlediska terénní praxe výhodné.

Literatura

- BEST W. R., 1967, Chloramphenicol-associated blood dyscrasias. A review of cases submitted to the American Medical Association registry. J. Am. Med. Assoc. 201 : 181-188.
- BRUNNER R. a kol., 1962, Die Antibiotica II. díl, Nürnberg.
- KONO M. a kol., 1968, Drug resistance of Staphylococci VI. Genetic determinant for chloramphenicol resistance. J. Bacteriol. 95 : 886-892.
- LEVINE J., FISCHBACH H., 1951, The chemical determination of chloramphenicol in biological materials. Antibiot. Chemother. 1 : 59-62.
- MARTÍNEK B., 1966, Lékové formy antibiotik pro veterinární použití. Studijní zpráva VÚFB.
- MODR Z., HERMANSKÝ M., VLČEK V., 1964, Antibiotika a jejich lékové formy. Praha, SZN.
- RIMÁROVÁ J., 1966, Chloramfenikol — hladiny po perorální a parenterální aplikaci. Farmakoterapeutické zprávy 12, 3 : 448.
- ŠEVČÍK B., PLÍŠEK K., HERMANSKÝ M., 1967, Příspěvek k vývoji stabilizovaného injekčního preparátu tetracyklinových antibiotik pro veterinární účely. Veterinaria 9 : 375-386.
- ŠEVČÍK B., DVOŘÁK M., PLÍŠEK K., 1969, Pomoc farmaceutického průmyslu při omezování mastitid skotu. Veterinářství XIX : 88-90.
- ŠMAHEL O., GRAFNETTEROVÁ J., SCHUCK O., 1967, Intravenózní distribuce chloramfenikolu a jeho metabolitů. Časopis lékařů českých 106 : 31-32; 873.

Došlo dne 15. 5. 1969

ШЕВЧИК Б., ДВОРЖАК М., ПЛИШЕК К. (Научно-исследовательский центр ветеринарных медикаментов, Спофа, Погоржи-Хотоунь, Чехословакия). Уровень хлорамфеникола в сыворотке крови телят, свиней и лошадей после внутримышечного введения инъекционного раствора. Вет. Мед. (Прага) 14 (11) : 617-623, 1969.

В четырех частных опытах мы определяли уровень хлорамфеникола в сыворотке крови телят, поросят, свиней и лошадей после введения с интервалами доз 15 % раствора D-хлорамфеникола в пропиленгликоле с 1 % Mesocain. Препарат мы ввели один раз внутримышечно. Наивысший уровень — 3,66 и 3,13 $\mu\text{g/ml}$ мы установили у телят через 1—3 часа после введения дозы 10 мг/кг живого веса, у свиней 1,53 $\mu\text{g/ml}$ после дозы 20 мг/кг живого веса и у поросят 2,17 $\mu\text{g/ml}$ после дозы 30 мг/кг живого веса, в обоих случаях через три часа после введения. У лошадей был достигнут наивысший уровень 1,05 $\mu\text{g/ml}$ через 6 часов после введения дозы 12 мг/кг живого веса. Уровень антибиотиков в сыворотке крови животных медленно понижался и через сутки после введения определялось количество хлорамфеникола, превышающее 0,2 $\mu\text{g/ml}$. У большинства животных не наблюдалось после введения препаратов ни местных, ни общих реакций.

D-хлорамфеникол; 15 % инъекционный раствор; уровень сыворотки

ŠEVČÍK B., DVOŘÁK M., PLÍŠEK K. (Research Centre for Veterinary Medicaments, SPOFA, Pohorí-Chotouň, Czechoslovakia). The Chloramphenicol Level in the Blood Serum of Calves, Pigs, and Horses after i. m. Application of the Injection Liquid. Vet. Med. (Praha) 14 (11) : 617-623, 1969.

In four partial experiments we investigated the level of chloramphenicol in the blood serum of calves, pigs, and horses after graduated doses of a 15% solution of D-chloramphenicol in propylene glycol with a 1% addition of Mesocaine. The preparation was applied in a single dose intramuscularly. The highest levels — 3.66 and 3.13 $\mu\text{g/ml}$ — were found in calves in from one to three hours after application of a dose of 10 mg per 1 kg of body weight, in pigs 1.53 $\mu\text{g/ml}$ after a dose of 20 mg per 1 kg of body weight, and in piglets 2.17 $\mu\text{g/ml}$ after a dose of 30 mg per 1 kg of body weight, in both cases in three hours after application. In horses the highest level of 1.05 $\mu\text{g/ml}$ was obtained in 6 hours after application of a dose of 12 mg per 1 kg of body weight. The levels of antibiotics in the blood serum of

the animals decreased gradually, and in 24 hours after application a quantity of chloramphenicol of over 0.2 $\mu\text{g/ml}$ was found. In a majority of the animals no local or general reactions were observed after application.

D-chloramphenicol; a 15% injection liquid; serum levels

ŠEVČÍK B., DVOŘÁK M., PLÍŠEK K. (Forschungsstelle für Veterinärmedikamente, SPOFA, Pohoří-Chotouň, Tschechoslowakei.) *Chloramphenicolspiegel im Kälber-, Schweine- und Pferdeblutserum nach i. m. Applikation der Injektionslösung.* Vet. Med. (Praha) 14 (11) : 617-623, 1969.

In vier Teilversuchen verfolgten wir die Chloramphenicolspiegel im Blutserum von Kälbern, Ferkeln, Schweinen und Pferden nach abgestuften Dosen einer 15% Lösung des D-Chloramphenicols in Propylenglykokol mit 1% Mesocainbeigabe. Das Präparat wurde einmalig intramuskulär appliziert. Die höchsten Spiegel — 3.66 und 3.13 $\mu\text{g/ml}$ stellten wir bei Kälbern in ein bis drei Stunden nach der Applikation von 10 mg/kg Lebendgew., bei Schweinen 153 $\mu\text{g/ml}$ nach 20 mg/kg Lebendgew. und bei Ferkeln 2.17 $\mu\text{g/ml}$ nach 30 mg/kg Lebendgewicht beider Fällen in drei Stunden nach der Applikation fest. Bei Pferden wurde der höchste Chloramphenicolspiegel 1.05 $\mu\text{g/ml}$ in 6 Stunden nach der Applikation von 12 mg/kg Lebendgewicht festgestellt. Die Antibiotikaspiegel im Blutserum der Tiere fielen allmählich ab. Nach 24 Stunden nach der Applikation wurden Chloramphenicolmengen von mehr als 0.2 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt. Bei der Mehrzahl der Tiere wurden nach Applikation des Präparats weder lokale noch Gesamtreaktionen beobachtet.

D-Chloramphenicol; 15% Injektionslösung; Serumspiegel

Adresa autorů:

MVDr. Bohumil Ševčík, CSc., RNDr. Miroslav Dvořák, MVDr. Karel Plíšek,
Výzkumné středisko pro veterinární léčiva Spofa, Pohoří-Chotouň

1. Die erste Gruppe ist die Gruppe der ...

2. Die zweite Gruppe ist die Gruppe der ...

3. Die dritte Gruppe ist die Gruppe der ...

4. Die vierte Gruppe ist die Gruppe der ...

5. Die fünfte Gruppe ist die Gruppe der ...

6. Die sechste Gruppe ist die Gruppe der ...

7. Die siebte Gruppe ist die Gruppe der ...

8. Die achte Gruppe ist die Gruppe der ...

9. Die neunte Gruppe ist die Gruppe der ...

10. Die zehnte Gruppe ist die Gruppe der ...

11. Die elfte Gruppe ist die Gruppe der ...

12. Die zwölfte Gruppe ist die Gruppe der ...

13. Die dreizehnte Gruppe ist die Gruppe der ...

14. Die vierzehnte Gruppe ist die Gruppe der ...

15. Die fünfzehnte Gruppe ist die Gruppe der ...

16. Die sechzehnte Gruppe ist die Gruppe der ...

17. Die siebzehnte Gruppe ist die Gruppe der ...

18. Die achtzehnte Gruppe ist die Gruppe der ...

19. Die neunzehnte Gruppe ist die Gruppe der ...

20. Die zwanzigste Gruppe ist die Gruppe der ...

21. Die einundzwanzigste Gruppe ist die Gruppe der ...

22. Die zweiundzwanzigste Gruppe ist die Gruppe der ...

POUŽITÍ INDIGOKARMÍNU K DETEKCI STREPTOMYCINU A CHLORAMFENIKOLU PŘI INTRAMAMMÁRNÍ APLIKACI JAKO ÚČINNÁ OCHRANA MLÉKÁREN A SPOTŘEBITELE PŘED MLÉKEM ZNEČIŠTĚNÝM ANTIBIOTIKY

M. Šťavíková

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

ŠTAVÍKOVÁ M. *Použití indigokarmínu k detekci streptomycinu a chloramfenikolu při intramammární aplikaci jako účinná ochrana mlékáren a spotřebitele před mlékem znečištěným antibiotiky.* Vet. Med. (Praha) 14 (11) 625-636, 1969.

Je popsáno použití indigokarmínu jako indikátoru vylučování antibiotik z mléčné žlázy po intramammární infúzi. Bylo vyzkoušeno přidávat barvivo v různých množstvích jednak ke streptomycinsulfátu, jednak k chloramfenikol-sukcinátu (vždy ve 20 ml fyz. roztoku). Aby byl streptomycin viditelně detekován indigokarmínem ještě alespoň ve 48 hodinách po infúzi, lze v našem případě pokládat za vyhovující dávku 400 mg barviva na 500 mg streptomycinu. Jednoduchou a rychlou metodou pomocí měniče iontů zachytíme barvivo, a tím i případné minimální koncentrace antibiotika obvykle ještě 72 hodin po aplikaci. Ke chloramfenikolu bude možno počítat s množstvím barviva pravděpodobně nižším – asi 300 mg indigokarmínu na 500 mg chloramfenikolu – neboť toto antibiotikum jsme určovali obvykle pouze při prvním nebo při druhém dojení. Nevýhodou infundování indigokarmínu je, že působí značně silné podráždění mléčné žlázy. To však poměrně rychle odeznívá a trvale špatné následky zjištěny nebyly. Zkouška zachování antibiotické aktivity po uložení indigokarmínu a streptomycinu ve směsi po dobu 7 měsíců při +5 °C v chladničce měla příznivý výsledek. Pokusy s vylučováním zkoušených látek, konané na klinicky zdravých vemenech, by měly být ověřeny na vemenech s porušenou sekrecí. Po zkouškách klinických by dále bylo vhodné prověřit zahraniční poznatky o neškodnosti zkrmování zbarveného mléka indigokarmínem jednak vyzkoušením patologického nahromadění barviva u drobných laboratorních zvířat (myši apod.), jednak krmnými pokusy na větších hospodářských zvířatech (telata, prasata). Podle literárních údajů a našich poznatků se jeví cesta barevných indikátorů jako nejrychlejší, nejjednodušší a z hlediska ekonomického nejlevnější metoda, jak předejít škodám v mlékárenské technologii a jak chránit zdraví spotřebitele.

mléko; rezidua antibiotik; streptomycin; chloramfenikol; barvení preparátů k léčbě mastitid; intramammární aplikace; ochrana mlékáren

V předchozí práci jsme se zabývali možností intramammární infúze roztoku indigokarmínu jako barevného indikátoru prokain-penicilinu G (obě látky byly rozpuštěny ve 20 ml fyz. roztoku a pomocí injekční stříkačky vpraveny strukovým dučejem do mléčné žlázy). Cílem pokusu bylo vyzkoušet způsob v některých zemích již osvědčený a omezit tak možnost předčasně prodávat mléko od léčených krav. Jelikož při tlumení mastitid se používají také jiná antibiotika, vyzkoušeli jsme ve druhé fázi pokusu přidávat indigokarmín také ke streptomycinu a chloramfenikolu.

Dawson a Feagan (1963) podávají zprávu o zkušenostech s přidáváním barviva Brilliant Blue FCF k dihydrostreptomycinu při intramamární aplikaci. Jako optimální se jim jeví kombinace 125 mg barviva na 100 mg dihydrostreptomycinu. Při léčbě mastitid dosáhli dobrých výsledků. Barvivo neovlivnilo účinnost antibiotika a vylučovalo se mlékem synchronně. Podle Franka a Schraudinha (1965) je uvedené barvivo totožné s indigokarmínem. Má několik synonymních označení. Němečtí výzkumní pracovníci ho např. označují Blau 2.

Naproti tomu Wetli (1963) zkoušel vhodnost používání barviva, ve Švýcarsku v současné době běžně užívaného, Grün S (= zeleň 4) k chloramfenikolsukcinátu pro intramamární aplikaci. Vylučování antibiotika zachytil v mléce maximálně při druhém dojení, zatím co barvivo bylo patrně o dvě až čtyři dojení déle. Zeleň 4 prokazoval jednak vizuálně, jednak pomocí Langeho fotoelektrického leukometru.

Obdobným problémem se zabýval rovněž Fritzsche (1964), který zkoušel přidávat barvivo Grün S jednak ke chloramfenikolu, jednak k tetracyklinu-HCl. Doporučuje používat k intramamární léčbě mastitid chloramfenikol v množství 500 mg a 50 mg Grün S na jednu čtvrt pro rychlejší vylučování, menší dráždivost a lepší terapeutický účinek než tetracyklin-HCl. Bauer a Klatt (1966) vyvinuli v Německu preparát k léčbě zánětů mléčné žlázy, který má název Galtimycin „blau“. Obsahuje 40 000 m. j. novokain-penicilinu, 20 000 μ g dihydrostreptomycinsulfátu a 50 mg modři 3 v 1 ml vodného přípravku. Uvedení autoři zkoušeli preparát na kravách zdravých. Zjistili, že se vylučuje rychle, do 48 až 56 hodin po aplikaci, přičemž antibiotikum i barvivo jsou vylučovány synchronně.

Weigtova a Möller (1966) vyzkoušeli úspěšně Galtimycin „blau“ na 45 čtvrtích s porušenou sekrecí. Ukázalo se, že přípravek má dobrou terapeutickou účinnost, avšak vyměšování barviva a antibiotik podléhá u nemocných krav značným výkyvům. Pouze 40 % ošetřených čtvrtí vylučovalo barvivo a antibiotika synchronně.

Z hlediska praktického využití barevného mléka byla několika výzkumnými pracovníky řešena otázka jeho zkrmování.

Dalgaard-Mikkelsen a Rasmussen (1962) krmili barevné mléko prasatům a telatům. Zvířata je ochotně přijímala. Byly zjištěny pouze nazelenalé výkaly. Po zabití byly vyšetřené orgány i svalovina prosty barevných odchylek. K obdobným výsledkům došli v Německu Bauer a Klatt (1966) při zkrmování modři myším, psům a prasatům.

MATERIÁL A METODIKA

Pokusy jsme opakovali na dvou zdravých dojnicích, jejichž průměrná užitkovost se pohybovala kolem 5 až 7 litrů/den. Nejprve byla zkoušena aplikace streptomycinsulfátu v dávce 250 mg a 500 mg na 1 čtvrt s různým množstvím indigokarmínu, později obdobně chloramfenikolsukcinátu v dávce 500 mg na jednu čtvrt. Do některých čtvrtí bylo aplikováno pouze antibiotikum, do některých roztok antibiotik a barviva a jiné čtvrtě byly ponechány jako kontrolní. Průkaz antibiotik a barviva, jakož i ostatní části metodiky, jsou obdobné jako v práci Šťavíková (1969). Za použití „mezinárodního standardu“ streptomycinsulfátu a „nár. standardu“ chloramfenikolu byly určeny hranice minimální citlivosti metod pro STM 0,62 až 1,25 μ g/ml mléka a pro chloramfenikol 1,25 až 2,5 μ g/ml. V prvních výdojcích silně zbarvených indigokarmínem bylo nutno určovat pozitivitu srovnáváním s kontrolním vzorkem antibiotik prostého mléka podle konzistence (částečně srazeno, úplně srazeno, nesrazeno). Obdobně posuzovali zbarvená mléka Weigtova a Möller (1966).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Množství streptomycinu a indigokarmínu v jednotlivých výdojcích (časový interval 6 nebo 12 hodin) bylo stanovováno zřetlovací metodou a výsledky jsou uvedeny v tabulce I. Kráva 603 byla dojena dvakrát za den, kráva 604 třikrát.

Při dávce 250 mg streptomycinu na čtvrt je možno naposled určit

hodin po aplikaci	% z celk. počtu případů (10)
30	20,0
36	20,0
48	60,0

Při dávce 500 mg streptomycinu na čtvrt

hodin po aplikaci	% z celk. počtu případů (12)
30	33,3
36	41,7
48	25,0

V našem pokuse jsme zjišťovali streptomycin naposled při dojení ve 48 hodinách. Metody, kterých jsme ke stanovování antibiotik použili, nezachytí sice streptomycin v tak nízkých koncentracích jako penicilin, ale mlékárenské kvasné procesy jsou na toto antibiotikum rovněž méně citlivé. Např. podle Holce a Klimeše (1964) je jogurtové kysání ohroženo teprve 80× vyšší koncentrací STM proti penicilinu. V případě viditelné detekce antibiotika ještě alespoň ve 48 hodinách po infúzi by bylo nutné přidávat k 500 mg streptomycinu asi 400 mg indigokarmínu. Z tabulky vidíme, že pomocí měniče iontů zachytíme barvivo ve většině případů asi o dvě až tři dojení déle než STM i při nižších dávkách indigokarmínu (300 mg a 200 mg). Je nutno brát však v úvahu poznatky jiných autorů, které v přehledu uvádí Terplan a Zaadhof (1967). Při citlivosti metody 1 μ g, což odpovídá také možnostem našim, určili Jacobs a Hanselaar (1966) streptomycin ještě ve 48 hodinách při dávce 300 mg/čtvrt. Uvarov (1960) po infúzi 500 mg streptomycinu/čtvrt jej určuje v 72 hodinách. Doba vylučování závisí přirozeně jako u všech antibiotik na druhu vehikula a na dojivosti krávy. Jestliže zvolíme vodný roztok a poměr STM : indigokarmínu 1,25 : 1, pak lze podle našich zkušeností předpokládat, že nebezpečné koncentrace antibiotika budou pomocí barevného indikátoru zachyceny. Obdobný poměr antibiotika a modři (použili však na rozdíl od nás modř 3) rovněž na zdravých kravách vyzkoušeli již výše jmenovaní němečtí autoři Bauer a Klatt (1966). V jejich pokusech, obdobně jako v našich, je vylučování infundovaných antibiotik a barviva obvykle ukončeno po 48 hodinách. V našem případě je nutno však brát v úvahu, že pokusy byly konány na kravách sice rovněž zdravých, ale s poměrně nízkou užitkovostí. Lze předpokládat, že u krav s vyšší dojivostí, nebo naopak u kusů nemocných, by nastaly poměry poněkud odlišné.

V tabulce II. jsou uvedeny výsledky pokusu s aplikací chloramfenikolu a indigokarmínu. Při zkoušení přibližně vylučovaného množství jednotlivých dojení nebylo možno zpravidla v dalších ředěních přímého výdojku nekontaminovaným mlékem antibiotikum zachytit, uvádíme proto pouze pozitivní a negativní výsledky (ne množství). Chloramfenikol se nám podařilo obvykle určit pouze při prvním, maximálně při druhém dojení po aplikaci.

Při dávce 500 mg chloramfenikolu na čtvrt je možno naposled určit

hodin po aplikaci	% z celk. počtu případů (34)
6	11,8
12	73,5
24	14,7

I. Výsledky pokusu s aplikací streptomycinu a indigokarmínu

[illegible]

604	PZ	0/200	125	7,81	0,488	0,122	0,061	0,061	0,030	0	0	0	0	1550
	LP	500/0	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1250
	LZ	500	3	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1597
		200	125	7,81	0,488	0,061	0,061	0,061	0,030	0	0	0	0	
603	PP	0/200		500	125		7,810	2,920		0,061	0,030		0	941
	PZ	500/0		3	1		1	0		0	0		0	1511
	LP	500/0		3	1		1	0		0	0		0	863
	LZ	0/200		31,20	0,976		0,061	0		0	0		0	1738
604	PZ	0/200	500	125	11,700	3,900	0,122	0,061	0,061	0,061	0,030	0	0	1308
	LP	250/0	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1093
	LZ	250	3	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1289
		200	500	125	7,810	2,920	0,061	0,061	0,061	0,030	0	0	0	
603	PZ	0/150		62,50	1,950		0,122	0,030		0	0		0	1586
	LP	500/0		3	3		2	1		0	0		0	916
	LZ	500		3	2		1	0		0	0		0	1701
		150		187	7,810		0,061	0,061		0	0		0	
603	PZ	0/150		187	7,810		0,122	0,061		0	0		0	1352
	LP	250/0		3	3		1	1		0	0		0	765
	LZ	250		3	3		1	1		0	0		0	1733
		150		187	3,900		0,061	0,030		0	0		0	

Poznámka: streptomycin

stupně $\mu\text{g/ml}$

0 > 0,62

1 od 0,62 — 6

2 6 — 60

3 60 — 600

4 600 — 6000

barvivo

hranice viditelnosti 0,25 $\mu\text{g/ml}$

hranice zachycení

iontoměničem Dowex 1×8 0,015 — 0,030 $\mu\text{g/ml}$

PZ pravá zadní čtvrt

LZ levá zadní čtvrt

PP pravá přední čtvrt

LP levá přední čtvrt

II. Výsledky pokusu s aplikací chloramfenikolu a indigokarmínu

[illegible]

603	PP	500/0		+	+		0	0		0	0		0	1040
	PZ	500/0		+	0		0	0		0	0		0	1482
	LP	0/200		125	15,60		0,488	0,122		0,061	0,030		0	1030
	LZ	0/200		125	7,81		0,488	0,061		0,030	0		0	2031
604	PP	500	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1512
		200	250	31,20	0,976	0,488	0,122	0,061	0,030	0	0	0	0	
	PZ	500	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1743
		200	125	7,81	0,488	0,061	0,061	0,030	0	0	0	0	0	
	LP	500/0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1312
603	PP	500/0		+	0		0	0		0	0		0	1025
	PZ	500/0		+	0		0	0		0	0		0	1442
	LP	500		+	0		0	0		0	0		0	1020
		300		125	62,50		0,488	0,122		0,061	0,030		0	
	LZ	500		+	0		0	0		0	0		0	1790
		300		62,50	3,90		0,244	0,061		0,061	0,030		0	
604	PP	500	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1420
		300	125	31,20	0,976	0,244	0,061	0,030	0,030	0	0	0	0	
	PZ	500/0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1417
	LP	500	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	1338
		300	250	31,20	0,976	0,488	0,061	0,061	0,030	0	0	0	0	

Pokračování tabulky II.

Pokračování tabulky II.

Kráva číslo	Čtvrť	Aplikované množství chloramfenikol — mg barvivo — mg	Vylučování chloramfenikolu $\mu\text{g/ml}$ barviva $\mu\text{g/ml}$											Průměrné množství mléka vydojené ze čtvrti ml/den
			doba po aplikaci v hodinách											
			6	12	24	30	36	48	54	60	72	78	84	
603	PP	500/0		+	0		0	0		0	0		0	759
	PZ	500/0		+	0		0	0		0	0		0	1403
	LP	500		+	0		0	0		0	0		0	726
		300		500	31,20		7,81	0,488		0,122	0,030		0	
	LZ	500		+	0		0	0		0	0		0	1483
		300		250	15,60		0,976	0,244		0,061	0,030		0	
604	PP	500	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1152
		300	500	62,50	7,81	0,488	0,122	0,061	0,061	0,030	0	0	0	
	PZ	500	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1544
		300	250	31,20	0,488	0,244	0,122	0,061	0,061	0,030	0	0	0	
	LP	500/0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1201

Poznámka: chloramfenikol

hranice průkaznosti 1,00—2,50 $\mu\text{g/ml}$ (+ +)

PZ pravá zadní čtvrt

LZ levá zadní čtvrt

PP pravá přední čtvrt

LP levá přední čtvrt

barvivo

hranice viditelnosti 0,25 $\mu\text{g/ml}$

hranice zachycení

iontoměničem Dowex 1 $\times$ 8 0,015—0,030 $\mu\text{g/ml}$

Nálezy odpovídají zjištěním Brunschwilera (1961) a Wetliho (1963). Autoři uvádějí dobu, kdy je možno ještě ve výdojku chloramfenikol určit 24 hodin po léčbě.

Z výše popsaných poznatků lze učinit závěr, že k vodnému roztoku chloramfenikolu by bylo možno přidávat nižší množství indigokarmínu než např. k prokain-penicilinu G nebo streptomycinu. Z tabulky vyplývá, že asi 300 mg barviva by stačilo viditelně detekovat nebezpečná množství antibiotika v prvních dvou dojeních a iontoměniči zachytíme případné zbytky obvykle o dvě dojení dále.

V tabulkách chybí jednotlivé čtvrtě, do nichž nebyla aplikována ani antibiotika ani barvivo. Zpravidla při infúzi byla ponechána jedna kontrolní čtvrt. V těchto 12 hodin po aplikaci byl streptomycin zachycen jednou, ve 24 hodinách dvakrát a dva výdojky vykazují rovněž nepatrné stopy ještě ve 24 a 36 hodinách (celkem bylo ponecháno 9 čtvrtí kontrolních). Ředěním výdojků mlékem prostým antibiotik se podařilo odhadnout vylučované množství čtvrtěmi kontrolními na 0,62 až 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Výskyt barviva zaznamenán nebyl.

V pokuse s chloramfenikolem se nepodařilo ani antibiotikum ani indigokarmín v kontrolních čtvrtích prokázat. Khalil (cit. podle Fritsche 1964) došel ve svých pokusech rovněž k závěru, že na rozdíl od antibiotik nejsou používaná barviva vemenem rezorbována. Pozorování se shoduje s poměry sledovanými na sliznici zažívacího traktu.

Hodnoty v tabulkách udávající vylučovaná množství barviva v $\mu\text{g}/\text{ml}$, dávají možnost vypočítat, při jakém zředění jednotlivých zbarvených výdojků mlékem nebarveným by se dal indigokarmín ještě pouhým okem nebo pomocí iontoměniče prokázat.

Reakce mléčné žlázy na infundované látky byla sledována NK-mastitis testem. Při aplikaci pouze antibiotik se objevuje ojediněle slabší podráždění, které však rychle odeznívá. Indigokarmín působí na mléčnou žlázu v prvních hodinách po infúzi značně dráždivě, avšak po 60 hodinách byl zpravidla NK-mastitis test již zcela negativní. Nižší dávky barviva způsobují podráždění menší. Co se týká vydojeného množství mléka z jednotlivých čtvrtí, do nichž byly látky aplikovány, jeví se, že mléčná žláza reaguje určitým poklesem nádoje. Denní průměr množství mléka z prvních čtyř až pěti dnů po aplikaci je obvykle nižší než průměrné hodnoty ze dnů pozdějších.

Ačkoliv bylo dvojici krav opakovaně, mnohdy každý týden, po dobu čtyř měsíců do některých čtvrtí infundováno barvivo nebo antibiotika, nedošlo k trvalým zjevným poruchám zdravotního stavu mléčné žlázy (dojnice byly občas vyšetřovány klinicky, mléko pak bakteriologicky a cytologicky — metodou náterů ze sedimentu).

Bylo rovněž vyzkoušeno, zda uložení směsi streptomycinu a indigokarmínu v chladničce při $+5^{\circ}\text{C}$ po dobu 7 měsíců ovlivní antibiotickou aktivitu. Po uvedené době nebyla snížena.

Indigokarmín se jeví tedy jako vhodný indikátor přítomnosti antibiotik, který by především bránil v prodeji kontaminovaného mléka. I když se předpokládá izolace nemocných dojnic, je nutno v běžném provozu připustit námitku, že je možno přehlédnouti zbarvené mléko při strojním dojení. Zachovávají-li se však zásady správného postupu, tedy oddojení a prohlédnutí prvních stříků mléka, musí být barevné mléko rozlišeno. K podobným závěrům došli Frank a Schraudy (1965). Rovněž svoz mléka ve velkých tancích by mohl vést chovatele k tomu, aby využil anonymity velkého množství mléka. Feagan

(1964) však uvádí, že v Austrálii ve státě Victoria po zavedení povinného přidávání barviva k antibiotickým preparátům nastal pokles zachyceného množství mléka s antibiotiky při svozu v konvích z 15 % na 0,4 % a při svozu v tancích z 80 % na 2,5 %.

Literatura

- BAUER F., KLATT P., 1966, Galtymycin „blau“ — ein farbstoffhaltiger Mastitispräparat. *MilchWiss.*, 21 : 677-683.
- BRUNSCHWILLER F., 1961, Die Ausscheidungsdauer verschiedener Antibiotika bei intramammärer Behandlung des Rindes. Diss. Bern.
- DALGAARD-MIKKELSEN S., RASMUSSEN F., 1962, Tracer dyes for rapid detection of antibiotic in milk. XVI. International Dairy Congress, Kopenhagen. Vol. C. Section VIII : 2, 465-473.
- DAWSON D. J., FEAGAN J. T., 1963, The use of Brilliant blue F.C.F. in dihydrostreptomycin intramammary preparations. *Aust. J. Dairy Technol.*, 18 : 15-18.
- FEAGAN J. T., 1964, The incidence of penicillin in Melbourne milk before and after the introduction of dye marking of penicillin preparations. *Aust. J. Dairy Technol.*, 19 : 76-80.
- FRANK H., SCHRAUDY E., 1965, Gefärbte Mastitismittel in der molkereitechnischen und tierärztlichen Praxis. *MilchWiss.*, 20 : 647-656.
- FRITSCHKE J. B., 1964, Untersuchungen über die Färbung von Chloramphenicol und Tetracyclin HCl für die intramammäre Behandlung beim Rind unter besonderer Berücksichtigung von Arzneimitteln in öl- und fetthaltiger Trägersubstanz. *Schweiz. Archiv. Tierheilk.*, 106 : 285-321.
- HOLEC J., KLIMES B., 1964, Vliv antibiotik na jogurtové zrní. *Sbor. VŠZ, ř. B.: Spisy Fak. vet.*, 12 : 363-369.
- JACOBS J., HANSELAAR J., 1966, Antibioticconcentraties in de melk van intramammair met antibiotica behan — delde runderen. *Tschr. diergeneesk.*, 91 : 896.
- ŠTAVÍKOVÁ M., 1969, Použití indigokarmínu k detekci prokain-penicilinu G při intramammární aplikaci jako účinná ochrana mlékáren a spotřebitele před mlékem znečištěnými antibiotiky. *Vet. Med. (Praha)* 14 (10) : 585-592.
- TERPLAN O., ZAADHOF K. J., 1967, Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch — eine kurze Übersicht. *MilchWiss.*, 22 : 761-768.
- WEIGTOVA U., MÖLLER M., 1966, Die Ausscheidung von Galtimycin „blau“ nach Behandlung sekretionsgetörter Euterviertel. *MilchWiss.*, 21 : 684-690.
- WETLI G., 1963, Untersuchungen über Chloramphenicol-Succinat-Färbung zur intramammären Behandlung von Kühen. Diss. Bern.
- UVAROV O., 1960, The concentration of some antibiotics in the milk after intramammary infusion. *Vet. Rec.*, 72 : 1228.

Došlo dne 9. 7. 1969

ШТЯВИКОВА М. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Применение индигокармина для определения наличия стрептомицина и хлорамфеникола при внутримаммарном применении как действенная охрана молочных заводов и потребителей против молока, загрязненного антибиотиками. *Вет. Мед. (Прага)* 14 (11) : 625-636, 1969.

Р работе описано применение индигокармина в качестве индикатора выделения антибиотиков из молочной железы после внутримаммарной инфузии. Испытывалось добавление красителей в различном количестве как для стрептомицинсульфата, так и хлорамфеникол-сукцината (всегда в 20 миллилитрах физиологического раствора). Для того, чтобы можно явно определить стрептомицин индигокармином еще по меньшей мере спустя 48 часов после вливания, можно в нашем случае считать удовлетворительной дозу 400 мг красителя на 500 мг стрептомицина. Простым и экспедитивным методом с помощью ионообменника мы уловим краситель, а следовательно, и возможные минимальные концентрации антибиотика, как правило, еще спустя 72 часа после вливания. Для хлорамфеникола можно предполагать, что количество красителя будет, вероятно, около 300 мг индигокармина на 500 мг хлорамфеникола, так как этот антибиотик мы определяли обычно только при первой или при второй дойке. Отрицательная сторона введения индигокармина в том,

что оно вызывает очень сильное раздражение молочной железы. Однако это сравнительно скоро проходит и постоянных плохих последствий не было установлено. Испытание сохранения антибиотической активности после введения индигокармина и стрептомицина в кормовые смеси в течение 7 месяцев при температуре $+5^{\circ}\text{C}$ в холодильнике дало благоприятные результаты. Опыты с выделением испытываемых веществ, проводимые на клинически здоровом вымени, следовало бы проверить на вымени с нарушенной секрецией. После клинических испытаний хорошо было бы проверить заграничные сведения о безвредности скармливания окрашенного индигокармином молока как путем проверки накопления красителя у мелких лабораторных животных (мышей и т. п.), так и путем кормовых опытов на более крупных сельскохозяйственных животных (свиньи, телята). Согласно литературным данным и нами полученным результатам метод цветных индикаторов антибиотиков представляется наиболее скорым, несложным и, с экономической точки зрения самым дешевым методом, как предупредить вред, наносимый молочной технологии, и как охранять здоровье потребителя.

молоко; остатки антибиотиков; стрептомицин; хлорамфеникол; окраска препаратов для лечения мастита; внутримаммарное применение; защита молочных

ŠTAVÍKOVÁ M. (Research Institute of Veterinary Medicine, Brno, Czechoslovakia). *Intramammary Application of Indigo Carmine for the Detection of Streptomycin and Chloramphenicol as an Effective Protection of Dairies and Consumers from Milk Polluted with Antibiotics*. Vet. Med. (Praha) 14 (11): 625-636, 1969.

There is a description of the application of indigo carmine as an indicator of the secreting of antibiotics from the mammary gland after intramammary infusion. Tested was the addition of staining materials in different quantities both to streptomycin sulphate and to chloramphenicol succinate (always in a 20 ml. physiological solution). For a visible detection of streptomycin by means of indigo carmine in at least 48 hours after infusion a dose of 400 mg of the staining material per 500 mg of streptomycin may be considered, in our case, satisfactory. By means of the simple and rapid method with the ion exchanger we retain the staining material and so also a minimum concentration of antibiotics usually as late as 72 hours after application. In the case of chloramphenicol it will be possible to apply probably a smaller quantity of the staining material — about 300 mg of indigo carmine per 500 mg of chloramphenicol — as this antibiotic was determined usually only in the first or second milking. A disadvantage of the infusion of indigo carmine is the fact that it causes a considerably strong irritation of the mammary gland. However, this disappears comparatively rapidly and no lasting harmful results were found. A test on the persistence of antibiotic activity after addition of indigo carmine to streptomycin during 7 months of storage at 5°C yielded a favourable result. The experiments carried out with the secretion of the tested substances from clinically healthy udders should be verified in udders with disturbed secretion. After the clinical tests it would further be suitable to check the foreign experiences regarding the harmlessness of the feeding of milk stained with indigo carmine, and that on the one hand by means of a testing of the pathological accumulation of the staining material in small laboratory animals (mice etc.) and, on the other hand, by means of feeding experiments carried out with larger farm animals (pigs, calves). According to the literary data and according to our own experience the dye-marking of antibiotics appears to be the fastest and simplest, and from the economical point of view also the cheapest method of preventing damage to the dairy technology and of protecting the health of the consumers.

milk; residues of antibiotics; streptomycin; chloramphenicol; staining of preparations for the treatment of mastitis; intramammary application; protection of dairies

ŠTAVÍKOVÁ M. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Benutzung des Indigokarmins zur Detektion des Streptomycins und Chloramphenicols bei intramammärer Applikation als wirksamer Schutz der Molkereien und Konsumenten vor mit Antibiotika verunreinigter Milch*. Vet. Med. (Praha) 14 (11): 625-636, 1969.

Es wird die Anwendung des Indigokarmins als Indikators der Ausscheidung von Antibiotika aus der Milchdrüse nach intramammärer Infusion beschrieben. Es wurde

die Beigabe des Farbstoffes in verschiedenen Mengen einerseits zum Streptomycin-sulfat, andererseits zum Chloramphenicolsukzinat (in stets 20 ml physiologischer Lösung) geprüft. Um das Streptomycin mit Indigokarmin wenigstens noch nach 48 Stunden nach der Infusion sichtbar detektieren zu können, genügt in unserem Fall die Dosis von 400 mg Farbstoff je 500 mg Streptomycin. Mit Hilfe der einfachen und schnellen Methode des Ionenautauschers erfaßt man den Farbstoff und damit eventuell auch die minimale Antibiotikakonzentration in der Regel noch 72 Stunden nach der Applikation der letzteren. Bei Chloramphenicol kann man voraussichtlich mit nur cca. 300 mg Indigokarmin je 500 mg Chloramphenicol rechnen, denn dieses Antibiotikum stellten wir in der Regel nur beim ersten oder zweiten Melken fest. Ein Nachteil der Indigokarmininfusion ist aber sehr starke Reizwirkung dieses Farbstoffs auf die Milchdrüse. Diese Wirkung ist aber verhältnismäßig von kurzer Dauer und hinterläßt keine dauernden unerwünschten Folgen. Der Test auf Erhaltung der Antibiotika-Aktivität nach Aufbewahrung des Indigokarmins und Streptomycins im Gemisch sieben Monate hindurch bei +5 °C im Kühlschrank hatte günstige Resultate. Die mit klinisch gesunden Eutern verwirklichten Versuche mit der Ausscheidung der geprüften Stoffe sollten bei Eutern mit Störungen der Sekretion überprüft werden. Nach den klinischen Testen wäre es weiter angezeigt, die ausländischen Erfahrungen über die Unschädlichkeit der Verfütterung der mit Indigokarmin gefärbten Milch einerseits durch Ermittlung der pathologischen Anhäufung des Farbstoffs bei Laboratoriumskleintieren (Mäusen u. ä.), andererseits durch Fütterungsversuche mit größeren landwirtschaftlichen Nutztieren (Schweinen, Kälbern) zu überprüfen. Den Literaturangaben und unseren Erkenntnissen gemäß erscheint die Benutzung von Farbstoffindikatoren als die schnellste, einfachste und ökonomisch vorteilhafteste Methode der Vorbeuge von Schäden in den Molkereien und des Schutzes der Gesundheit des Konsumenten.

Milch; Residuen von Antibiotiken; Streptomycin; Chloramphenicol; Färbung von Präparaten zur Behandlung der Mastitiden; intramammäre Applikation; Schutz der Molkereien

Adresa autorů:

Ing. M. Šťavíková, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno-Medlánky

STANOVENÍ AKTIVITY KYSELÉ FOSFATÁZY (ACP) U KOHOUTKŮ PLEMENE LEGHORNKA BÍLÁ V ČASNÉ POSTINKUBAČNÍ ONTOGENEZE

Z. Sova, J. Jícha, K. Koudela, J. Houška

VSZ, katedra fyziologie hospodářských zvířat, Praha - Suchdol
KU, lékařská fakulta, odd. klinické biochemie, Hradec Králové

SOVA Z., JÍCHA J., KOUDELA K., HOUSKA J. Stanovení aktivity kyselé fosfatázy (ACP) u kohoutků plemene leghornka bílá v časně postinkubační ontogeneze. Vet. Med. (Praha) 14 (11) : 637-642, 1969.

Aktivita kyselé fosfatázy, stanovená metodou podle Bessey, Lowry a Brock (1946), byla určena v 11 věkových intervalech ze 45 směsných vzorků z celkového počtu 670 kohoutků plemene leghornka bílá. V prvním týdnu stáří kuřat kolísala aktivita kyselé fosfatázy v rozmezí $5 \pm 3,4$ U až $7,6 \pm 4,4$ U. U starších kuřat 11 a 42denních byly zjištěny hodnoty 5 až 7krát nižší v rozmezí $0,6$ až $1,3 \pm 0,2$ U s výjimkou 21. dne ($4,5 \pm 0,7$ U). Předpokládá se, že zvýšená aktivita je způsobena především rozpadem jaderných ptačích erytrocytů v prvním týdnu života.

drůbež; sérum; vývoj; aktivita kyselé fosfatázy

Při studiu základních hodnot v krvi kuřat během časného postinkubačního vývoje jsme též stanovili některé enzymy. Kromě toho, že jsme sledovali aktivitu alkalické fosfatázy (Sova, Jícha, Koudela, Houška 1969), SDH, MDH, LDH a její izoenzymy (Sova, Jícha, Koudela, Houška 1968), GOT a GPT (Koudela, Sova, Hofman 1969), jsme stanovili též ACP.

Fosfatázy jsou důležité esterázy, štěpící kyselinu fosforečnou z různých organických sloučenin (nukleotidů, fosfatidů, cukerných fosfátů a jiných látek). Podle mechanismu účinku rozlišujeme hydrolázy fosfomonoesterů (3.1.3) a hydrolázy fosfodiesterů (3.1.4), která katalyzují odštěpení jednoho ze dvou zbytků diesterů. Zvrat hydrolytické reakce činností fosfatáz není možný a tak např. syntéza fosforečných esterů je uskutečňována jinými enzymy. U některých leží optimum pH v oblasti alkalické (pH 7 až 9,5), u jiných v oblasti kyselé (4,5 až 6). Mluvíme potom o kyselé fosfatáze (3.1.3.2) nebo o alkalické fosfatáze (3.1.3.1.). Stanovení obou fosfatáz patří vedle aldolázy k prvním enzymatickým testům, které byly využívány v klinické enzymologii. U savců se uvádí nejvyšší aktivita ACP v prostatě (Vítková 1967). U krys prokázali Manning a kol. (1966) nejvyšší aktivitu ACP ve slezině, pak v ledvinách, tenkém střevě, játrech, plicích a srdci, relativně nízké aktivity v ostatních tkáních a orgánech. Raabe (1952) našel vyšší aktivitu ACP v hemolyzovaných sérech než v sérech normálních nebo v krevní plazmě, v erytrocytech udává 150 až 200krát vyšší aktivitu ACP než v krevním séru. Südhof a Vötzel

(1960) pozorovali pokles aktivity ACP v séru při uchování v pokojové teplotě, při uložení vzorku v lednici při 4 °C byl tento pokles aktivity nižší.

U ptáků jsou údaje skromné. Sanz a Lorenzo (1950) stanovili aktivitu ACP v oviduktu, McDaniel a Chute (1961) sledovali aktivity některých enzymů v ontogeneze, mezi nimi i ACP. Jejich nejmladší kuřata byla pětítýdenní, nejstarší půlroční. U zdravých slepic plemene leghornka bílá a u slepic nemocných lymfomatózou stanovili aktivitu ACP Leshera Burmester (1955), u drůbeže s osteoporózou a osteopetrózou Bell (1961).

Konečně lokalizaci ACP v granulech leukocytů ve střevě drůbeže se zabýval elektronmikroskopickým sledováním Holman (1968), Dounce a Siebel (1943) zjišťovali obsah ACP v jádrech drůbežích erytrocytů.

MATERIÁL A METODY

Aktivita ACP byla stanovena metodou podle Bessey, Lowry a Brocka (1946). Jako substrát byl použit p-nitrophenylfosfát v 0,1 M acetátovém pufru o pH 5,4. Vzorek je inkubován při 25 °C po 60 min., enzymatická reakce je pak ukončena přidáním NaOH. Zabarvení, jež dodá uvolněný p-nitrofenol, je fotometrováno. Maximum absorbance je při 400 nm, pro rutinní potřebu se měří ve vrstvě o síle 1 cm na okraji viditelné oblasti při 415 nm. Výsledky jsou vyjádřeny v mezinárodních jednotkách. Měříme proti slepé zkoušce, kdy inkubujeme substrát samotný a sérum přidáme až po alkalizaci. Mezinárodní jednotka (U) je definována jako ono množství enzymu v 1000 ml séra, jež je schopné za minutu rozštěpit 1 mol substrátu při 25 °C a pH 5,4. Chyba metody při hodnotě ACP 8,2 U je $\pm 0,59$ U (7,2 %).

Aktivita ACP byla stanovována ze skupinových vzorků séra. Kohoutci plemene WL byli vykrvováni dekapitací, aktivita byla v séru stanovena do 24 hod. po zabíjení. U mladších kuřat (do stáří 7 dnů) byly skupinové vzorky z 10 až 20 kuřat, u starších než týden byly skupinové vzorky z 3 až 10 zvířat.

Kohoutci, použití k pokusu, byli chováni v bateriích odchovny katedry za běžných zootechnických podmínek při omezené pohybové aktivitě. Kuřata byla krmena směsí K pro odchov kuřat, od stáří 14 dnů dostávala grit, po celou dobu vodu *ad libitum*. Aktivita ACP byla stanovena ve 45 směsných vzorcích z 670 kuřat. Skupiny téhož věku byly statisticky zhodnoceny ($\bar{x}$, s , s^2 , $V\bar{x}$) početní stanici VŠZ v Praze, za což jí patří náš dík.

VÝSLEDKY A DISKUSE

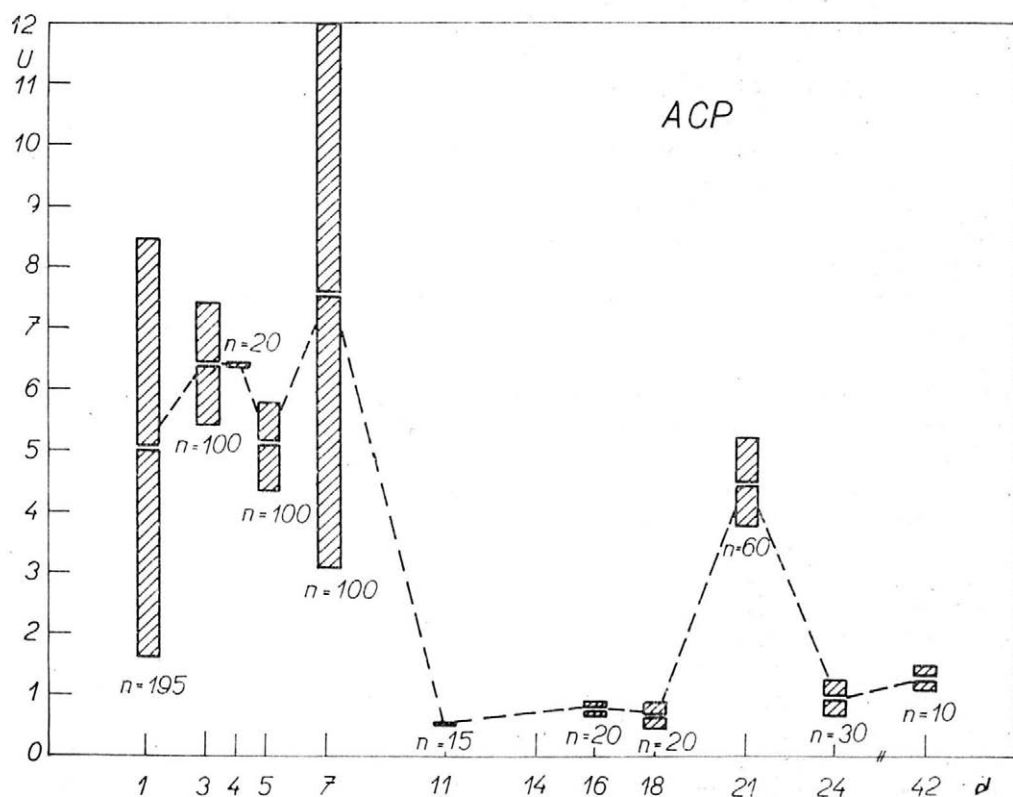
Dosažené výsledky jsou uvedeny v tabulce I a na obr. 1.

Z výsledků vyplývá, že ACP v prvních 7 dnech věku se pohybovala v relativně vyšších hodnotách kolem 5 až 7 U, přičemž ovšem byl uvnitř jednotlivých věkových souborů pozorován značný rozptyl naměřených hodnot: první den 1,4 až 9,2 U, třetí den 4,8 až 8 U, sedmý den 1,4 až 14 U.

Od 11. dne věku byly prokázány již nízké hodnoty v rozmezí kolem 0,6 U až 1,3 U, přičemž výjimku tvořilo měření u třítýdenních kuřat, kdy byl pozorován vzestup aktivity ACP v průměru až na 4,5 U s rozmezím 3,2 až 4,8 U. Analogický vzestup 21. dne při sledování alkalické fosfatázy (ALP) nebyl pozorován.

I. Aktivita kyselé fosfatázy u kuřat v časné postinkubační ontogeneze

Stáří kuřat ve dnech	<i>n</i>	$\bar{x}$	$\hat{s}$	$\hat{s}_{\bar{x}}$	$V_{\bar{x}}$
1	195	4,99	3,4	0,22	67,1
3	100	6,40	1,0	0,10	15,9
4	20	6,40	—	—	—
5	100	5,10	0,7	0,06	13,0
7	100	7,60	4,4	0,43	57,3
11	15	0,60	—	—	—
16	20	0,80	0,1	0,02	11,5
18	20	0,70	0,2	0,04	25,5
21	60	4,50	0,7	0,08	14,9
24	30	1,00	0,3	0,06	34,5
42	10	1,30	0,2	0,06	14,4



1. Hodnoty ACP u kuřat různého stáří

Jak vyplývá z tabulky I i z obr. 1, je u kuřat první den postinkubačního života charakterizován výrazně zvýšenou aktivitou ACP, její hodnoty jsou 5 až 7krát vyšší než u starších kuřat. Při srovnání těchto výsledků s naší předchozí prací (S o v a a kol. 1969), v níž byla prakticky z téhož materiálu stanovena i ALP, vidíme, že není vztah mezi aktivací obou fosfatáz. V dostupné literatuře jsme nezjistili, že by se byl někdo zabýval otázkou stanovení ACP u kuřat v prvních dnech života. M c D a n i e l a C h u t e (1961) zjistili u 5 až 10 týdnů starých kuřat hodnoty ACP $0,315 \pm 0,152$ U až $0,682 \pm 0,239$ U. Jde o hodnoty velmi blízké těm, jež jsme naměřili u kuřat starších než 11 dnů. Citovaní autoři neprokázali signifikantní rozdíly v aktivitě ACP mezi 10týdenními a 17týdenními kuřaty plemene leghornka bílá.

Aktivitu ACP 3,3–7,4 U uvádí B e l l (1961) u kuřat ve stáří 15 až 18 týdnů, další vzestup pak u kuřat nemocných osteoporózou (osteoklasty obsahují ACP), ovšem B e l l používá jiné definice pro mezinárodní jednotku (U = mg 4 nitrofenolu, uvolněného ve 100 ml plazmy za 1 hod. v 0,211 citrátového či acetátového pufru o pH 4,9 při 37 °C). Naproti tomu u kuřat s floridní osteopetrózou nebyly shledány rozdíly mezi zdravými a nemocnými (osteoklasty se nacházejí vzácně).

Naskytá se otázka, jaká je příčina vysoké aktivity kyselé fosfatázy v prvním týdnu života kuřat. U ptáků nepřichází v úvahu zdroj z prostaty a zřejmě zde nejde ani o původ zvýšené aktivity ACP z rostoucích kostí. Nejpravděpodobnější vysvětlení lze hledat v rozpadu jader erytrocytů, pro což svědčí i čtyřnásobně zvýšená hladina celkového bilirubinu u drůbeže v prvním týdnu života proti starším, jak jsme prokázali jinde (S o v a, K o u d e l a, N ě m e c, H o u š k a, M a t ě j s o v á 1969). Sedmý den života jsme pozorovali v jiné práci (V r b e n s k á, S o v a, F o j t í k o v á, F o r s t o v á, v tisku) nejnižší hodnoty erytrocytů (ϕ 2 000 000/1 cmm) během prvního měsíce života. I tato skutečnost potvrzuje výše uvedenou domněnku. Další možné vysvětlení vysoké aktivity ACP souvisí s výživou ze žloutkového vajíčka. Z naší práce (S o v a, J í c h a, K o u d e l a, H o u š k a 1969) i z výsledků dosud neuveřejněných vyplývá, že jsou u kuřat v prvním týdnu postinkubačního života vysoké hladiny lipidů (cholesterolu, esterifikovaných i neesterifikovaných mastných kyselin a fosfolipidů), dochází k transportu lipidů ze žloutkového vajíčka do jater, kde se rovněž typicky mění do žluta jejich barva (P r o c h á z s k a a S z e k y 1966). V té době dochází v játrech k výraznému vzestupu a ukládání glykogenu (H o u š k a 1967). Podle J i n d r y, Š í p a l a a K o v a c z e (1966) může jít též o zvýšené uplatnění kyselých fosfatáz v následujících pochodech v metabolismu lecitinu: aktivita fosfolipázy B katalyzuje odštěpení obou zbytků mastných kyselin a zbylá kyselina cholin glycerolfosforečná je štěpena specifickou fosfodiesterázou na cholin a glycerolfosfát. Glycerolfosfát je pak rozkládán nespecifickými fosfatázami (mezi nimi kyselou fosfatázou) dále na kyselinu fosforečnou a glycerol. Ten je pak v našem případě zřejmě využit v glykogenogeneze. Podle tohoto schématu by mohla mít zvýšená aktivita kyselé fosfatázy i své biologické opodstatnění. Je nutno ovšem konstatovat, že uvedený mechanismus je popisován ve střevích (J i n d r a a kol. 1966). Nicméně jednotlivé orgány se liší intenzitou přeměny lecitinu, značnou roli zde hrají i ledviny (H a m s í k, Š a n t a v ý 1956). Zatím nemůžeme zodpovědně posoudit, který z obou popsáných systémů je důležitější, zvýšená bilirubinaemie a pokles erytrocytů kolem 7. dne věku hovoří spíše pro původ zvýšené aktivity ACP z jader erytrocytů.

Literatura

- BELL D. J., 1961, Plasma Acid Phosphatase Activity and Bone Dystrophies in Domestic Fowl. *Biochem. J.* 80 : 44-54.
- BESSEY D. A., LOWRY O. H., BROCK M. J., 1946, A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164 : 321-324.
- DOUNCE A. L., SEIBEL D., 1943, Acid phosphatase content of nuclei of chicken erythrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 54 : 22-32.
- HAMŠÍK A., ŠANTAVÝ F., 1956, *Lékařská chemie*. Biochemie IX. SZN, Praha.
- HOLMAN J., 1968, Ultrastructural localization of acid phosphatase in the specific granules of globule leucocytes of the chick intestine. *Acta histochem.* 31 : 212-214.
- HOUŠKA J., 1967, Věkové změny obsahu glycidů v těle kuřat v postinkubačním období. Kandid. disert. práce Brno.
- JINDRA A., ŠÍPAL Z., KOVÁCS P., 1966, *Učebnice biochemie pro farmaceuty*, SZN Praha.
- KOUDELA K., SOVA Z., HOFMAN J., 1969, Aktivita aminotransferáz asparagátu a alaninu v krevním séru kuřat v prvním měsíci života. *Vet. Med. (Praha)* 14 (2) : 123-128.
- LESHER S., BURMESTER B. R., 1955, Plasma phosphatase activities of normal and lymphomatose chickens. *Cancer Res.* 15 : 537-540.
- MANNING J. P., BABSON A. L., BUTLER M. C., PRIESTER S. F., 1966, Determination of Acid Phosphatase Activity in Tissue Homogenates. *Canad. J. Biochem.* 44 : 755-761.
- MCDANIEL L. L., CHUTE H. L., 1961, Enzyme activity levels in chicken plasma. *Am. J. Vet. Res.* 22 : 99-103.
- PROCHÁZSKA L., SZÉKY A., 1966, Histologische und biologische Vorgänge in der Leber von Tagesküken. *Zbl. Vet. Med. Reihe A.* 13 : 264-269.
- RAABE S., 1952, Neue Wege in der biochemischen Diagnostik des metastasierenden Prostatakrebses. *Zbl. Chirurg.* 77 : 1888-1896.
- SANZ L., LORENZO H., 1950, cit. VÍTKOVÁ, Enzymatické testy v kontrole zdraví hospodářských zvířat. *Studijní informace ÚVTI* : 1-68.
- SOVA Z., JÍCHA J., KOUDELA K., HOUSKA J., 1968, Determination of the Activity of L-Iditol: NAD Oxidoreductase (SDH), of L-Malate: NAD Oxidoreductase (MDH) and of L-Lactate: NAD Oxidoreductase (LDH) and of their Isoenzymes in the Blood Serum of Chicken in the Early Post-incubation Period. *Comp. Biochem. Physiol.* 27 : 287-297.
- SOVA Z., JÍCHA J., KOUDELA K., HOUSKA J., 1969, Stanovení aktivity alkalické fosfatázy (ALCP) u kohoutků plemene leghornka bílá v časně postinkubační ontogeneze. *Vet. Med. (Praha)* 14 (1) : 69-74.
- SOVA Z., JÍCHA J., KOUDELA K., HOUSKA J., 1969, The Values of Cholesterol, Phospholipids and Esterified Fatty Acids in WL Chicken in the First Month of Life. *Zbl. Vet. Med. Reihe A* 16 : 168-175.
- SOVA Z., KOUDELA K., NĚMEC Z., HOUSKA J., MATĚJUSOVÁ D., 1969, Hodnoty volného bilirubinu, bilirubinmono- a diglukuronidů v séru kuřat v časně postinkubační ontogeneze. *Sborník 2. celostát. konference o fyziologii drůbeže*, Praha.
- SÜDHOF H., VÖTZEL E., 1960, Über die Haltbarkeit von zur Enzymaktivitätsbestätigung vorgesehenen Serumproben. *Klin. Wschr.* 38 : 1165-1167.
- VÍTKOVÁ K., 1967, Enzymatické testy v kontrole zdraví hospodářských zvířat. *Studijní informace ÚVTI* : 1-68.
- VRBENSKÁ A., SOVA Z., FOJTÍKOVÁ A., FORSTOVÁ D., v tisku, Hemogram u kohoutků WL v časně postinkubační ontogeneze. Erythrocyty, hemoglobin a hematokrit. *Sborník AF VŠZ v Praze*.

Došlo dne 11. 4. 1969

SOVA Z., JÍCHA J., KOUDELA K., HOUSKA J. (Сельскохозяйственный институт, кафедр физиологии сельскохозяйственных животных, Прага, Чехословакия). Определение активности кислой фосфатазы (ACP) у петушков породы леггорн белый в период раннего посленинубационного онтогенеза. *Вет. Мед. (Прага)* 14 (11) : 637-642, 1969.

Активность кислой фосфатазы, установленная по методу Бессей, Лаури и Брок (1946), была определена в 11 возрастных интервалах у 45 смешанных образцов из общего количества 670 петушков породы белый леггорн. На первой неделе жизни цыплят кислая фосфатаза находилась в пределах $5 \pm 3,4$ U — $7,6 \pm 4,4$ U. У цыплят же в возрасте 11–42 дней установлены в 5–7 раз меньше величины в диапазоне $0,6 - 1,3 \pm 0,2$ U, за исключением 21-го дня ($4,5 \pm 0,7$ U). Предполагается, что повышенная активность вызвана, прежде всего, распадом ядерных птичьих эритроцитов на первой неделе жизни.

птица; сыворотка; развитие; активность кислой фосфатазы

SOVA Z., JÍCHA J., KOUDELA K., HOUŠKA J. (University of Agriculture, Chair of the Physiology of Domestic Animals, Prague, Czechoslovakia). *The Determination of the Effect of Acidic Phosphatase (ACP) in the Cockerels of the White Leghorn Breed in an Early Post-incubation Ontogenesis*. Vet. Med. (Praha) 14 (11): 637-642, 1969.

The activity of acidic phosphatase determined according to the Bessey, Lowry & Brock method (1946) was studied on 11 age stages in 45 mixed samples of a total of 670 cockerels of the White Leghorn breed. During the first week of the age of the chicken, the activity of acidic phosphatase ranged from 5 ± 3.4 U to 7.6 ± 4.4 U. In older chickens (11–42 days), the values were found 5–7 times lower, ranging from 0.6 to 1.3 ± 0.2 U, with the exception of the 21st day (4.5 ± 0.7 U). The increased activity is assumed to be due particularly to the break-up of nuclear avian erythrocytes during the first week of life.

poultry; serum; development; acidic phosphatase activity

SOVA Z., JÍCHA J., KOUDELA K., HOUŠKA J. (Hochschule für Landwirtschaft, Lehrstuhl der Physiologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Praha, Tschechoslowakei). *Bestimmung der Aktivität der saueren Phosphate (ACP) bei weißen Leghornhähnen in der frühen Postinkubationsontogenese*. Vet. Med. (Praha) 14 (11): 637-642, 1969.

Bei insgesamt 670 weißen Leghornhähnen wurde in 45 Mischproben in 11 Altersintervallen mit Hilfe der Methode nach Bessey, Lowry und Brock (1946) die Aktivität der saueren Phosphatase bestimmt. In der ersten Lebenswoche der Küken schwankte die Aktivität der saueren Phosphatase in den Grenzen von $5 \pm 3,4$ U bis $7,6 \pm 4,4$ U. Bei älteren, 11-42tägigen Küken waren die ermittelten Werte 5–7fach niedriger und bewegten sich in den Grenzen von 0,6 bis $1,3 \pm 0,2$ U mit Ausnahme des 21. Tages ($4,5 \pm 0,7$ U). Man setzt voraus, daß die erhöhte Aktivität vor allem durch Zerfall der Vogel-Kern-Erythrozyten in der ersten Lebenswoche verursacht wird.

Geflügel; Serum; Entwicklung; Aktivität der saueren Phosphatase

Adresy autorů:

Prof. MVDr. Zdeněk Sova, DrSc., MVDr. Karel Koudela, CSc., MVDr. Jiří Houška, CSc., VŠZ, katedra fyziologie hospodářských zvířat, Praha-Suchbát
MUDr. J. Jícha, Lékařská fakulta KU, odd. klinické biochemie, Hradec Králové

INAKTIVACE VIRU INFEKČNÍ HEPATITIDY PSŮ TEPEM

G. Petr, E. Jiran

Biověta Terezín

PETR G., JIRAN E. *Inaktivace viru infekční hepatitidy psů teplem*. Vet. Med. (Praha) 14 (11): 643-651, 1969.

Studovali jsme termostabilitu viru infekční hepatitidy psů z tkáňových kultur psích ledvinných buněk při pH 7,2. Virus je velmi stabilní, s poločasy 100 dní, 11 dní a 1,5 dne při teplotách 4 °C, 20 °C a 37 °C a s poločasy 4,5 hodiny, 20 minut a 0,8 minuty při teplotách 48 °C, 52 °C a 56 °C. Zjistili jsme, že inaktivace infekčnosti viru infekční hepatitidy psů teplem probíhá v rozmezí teplot 4 °C a 56 °C ve dvou termodynamicky odlišných reakcích, které se kříží při 46,7 °C. Odpovídající aktivační energie a entropie činí pro teploty pod 46,7 °C 22 kcal/mol a 1,4 cal/mol/grad a pro teploty nad 46,7 °C 152 kcal/mol a 424 cal/mol/grad.

virus infekční hepatitidy psů; tepelná inaktivace viru; aktivační energie a entropie

Studium tepelné inaktivace je součástí sledování základních vlastností různých virů. Rovněž na našem pracovišti jsme proto zařadili tyto práce do studia viru infekční hepatitidy psů (virus HCC).

Před počátkem této práce nebyly podrobnější informace o stabilitě viru HCC při různých teplotách téměř dostupné. Pouze Fastier (1958) uvádí, že virus HCC z tkáňových kultur je inaktivován za 10 minut při 56 °C. Ve všeobecné charakteristice skupiny adenovirů, k níž virus HCC náleží, se uvádí, že psí adenovirus je poměrně stabilní při teplotách nižších, avšak při teplotě 56 °C je inaktivován snadno (Pereira a kol. 1963). Další příbuzný psí adenovirus, izolovaný z případů infekční larvngotracheitidy psů (ILC) Ditchfieldem a kol. (1962), byl studován při teplotách 4 °C, 37 °C a 56 °C Yamamoto (1966). Pro důkladnější poznání vlastností viru HCC jsme chtěli tyto kusé zprávy doplnit podrobnějším studiem vlivu teploty na virus HCC.

Dále se ukázalo, že inaktivace živočišných virů teplem je komplexním jevem. Nasvědčují tomu termodynamické parametry získané inaktivací při teplotách vyšších i nižších, které se od sebe podstatně liší. Práce tohoto druhu byly většinou dělány s riboviry, obsahujícími kyselinu ribonukleínovou. Deoxyviry, jejichž charakteristikou je kyselina deoxyribonukleínová, a mezi něž patří i virus HCC, byly dosud studovány ojedinele, např. Sharpem a kol. (1964) s virem vakcinie nebo Krugmanem a kol. (1964) s lidským cytomegalovirem.

MATERIÁL A METODY

TKÁŇOVÉ KULTURY. Jako tkáňové kultury sloužily primární kultury psích ledvinných buněk (TK PSL), jak jsme je popsali již dříve (Jiran 1964), které byly pomnožovány v Earleho roztoku solí s přidávkou 0,5 % laktalbuminu.

hydrolyzáta a 10 % telecího séra. Jako záchovné medium pro kulturu sloužil stejný Earleho roztok solí, avšak bez přídavku telecího séra.

INFEKČNÍ MATERIÁL. Pro přípravu infekčního materiálu sloužil virus HCC, kmen CORNELL-1 v 91. až 96. pasáží. Tímto kmenem infikované TK PSL v Roux-láhvích byly v době maximálního cytopatického efektu (CPE), tj. asi za čtyři dny slity, suspenze odstředěna 20 minut při 2000 obr./min. a supernatant uložen při -40°C .

TITRACE INFEKTIVITY. Pro titraci infekivity bylo použito zkumavkových subkultur psích ledvinných buněk. Titrovaný materiál byl připraven v desetinasobných ředěních, na každé ředění bylo použito čtyř až pěti zkumavkových kultur. Každá zkumavková kultura byla infikována 0,1 ml ředěného materiálu a na kulturu bylo doplněno záchovné medium v množství 0,9 ml. Titrace jednotlivých vzorků byly posuzovány za 6 dní inkubace při 37°C a hodnoceny podle CPE. Titr byl vypočítán podle Kärbera (1931).

INAKTIVACE TEPLEM. Inaktivační pokusy byly dělány ve vodní lázni pomocí ultratermostatu. Suspenze viru byla překontrolována na pH a případně upravena tak, aby výsledné pH činilo 7,2. Při nižších teplotách, při nichž inaktivace probíhala pomaleji, byla suspenze rozplněna po 5,0 ml do zkumavek o obsahu 7 ml. Všechny zkumavky určené k pokusu byly uloženy do kovového stojanu a vloženy do předem vyhřáté lázně. Jakmile teplota kontrolní zkumavky s teploměrem dosáhla požadované teploty, byl zaznamenán čas 0 a odebrán první vzorek, sloužící jako kontrolní hodnota suspenze viru před inaktivací. Další vzorky byly odebírány v daných časových intervalech a ihned po odebrání ochlazeny v ledové lázni, kde jimi bylo asi půl minuty otáčeno. Nakonec byly všechny zkumavky při dlouhodobém pokusu uloženy při -40°C a při krátkodobém pokusu při $+4^{\circ}\text{C}$ do chvíle, kdy byly všechny vzorky najednou použity k titraci pro stanovení obsahu aktivního viru HCC.

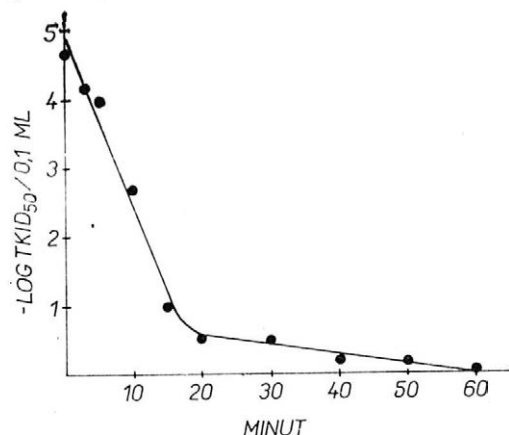
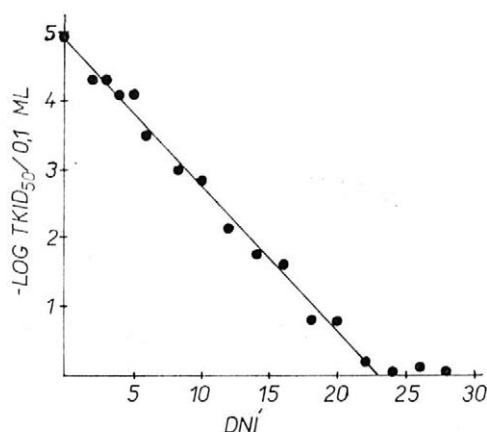
Při teplotách vyšších (52°C až 56°C) bylo postupováno tak, že řada zkumavek, obsahujících 4,5 ml záchovného media, byla vložena do vodní lázně k vytemperování. Jakmile teplota dosáhla požadované výše, bylo do každé zkumavky přidáno co nejrychleji 0,5 ml infekční suspenze, mírně protřepáno a zaznamenán čas 0. Opět byly v pravidelných intervalech odebírány vzorky a po ochlazení v ledové lázni uloženy k dalšímu zpracování při $+4^{\circ}\text{C}$.

Při dlouhodobých pokusech, kdy byly zkumavky uloženy při dané teplotě po dobu několika týdnů či měsíců, bylo občas kontrolováno pH. Bylo zjištěno, že se pH měnilo pouze nepatrně a zřídka přesáhlo hodnotu pH 7,3. Tomu pravděpodobně napomáhal malý vzduchový prostor ve zkumavkách s infekční suspenzí.

VÝSLEDKY

1. INAKTIVACE VIRU HCC PŘI RŮZNÝCH TEPLITÁCH

Závislost infekivity viru HCC na čase při 37°C je znázorněna na obr. 1. Tato závislost je vyjádřena přímkou, jejíž průběh se nemění během celé inaktivace až do vymizení infekivity. Takový průběh nasvědčuje tomu, že inaktivace sleduje reakci prvního řádu. Pro větší přesnost bylo všech pokusných hodnot použito k výpočtu lineární regrese metodou nejmenších čtverců, aby mohly být zohledněny i ty body, které neleží přímo na přímce. Parametrů rovnice bylo pak



1. Inaktivace infekitivity viru infekční hepatitidy psů při 37 °C

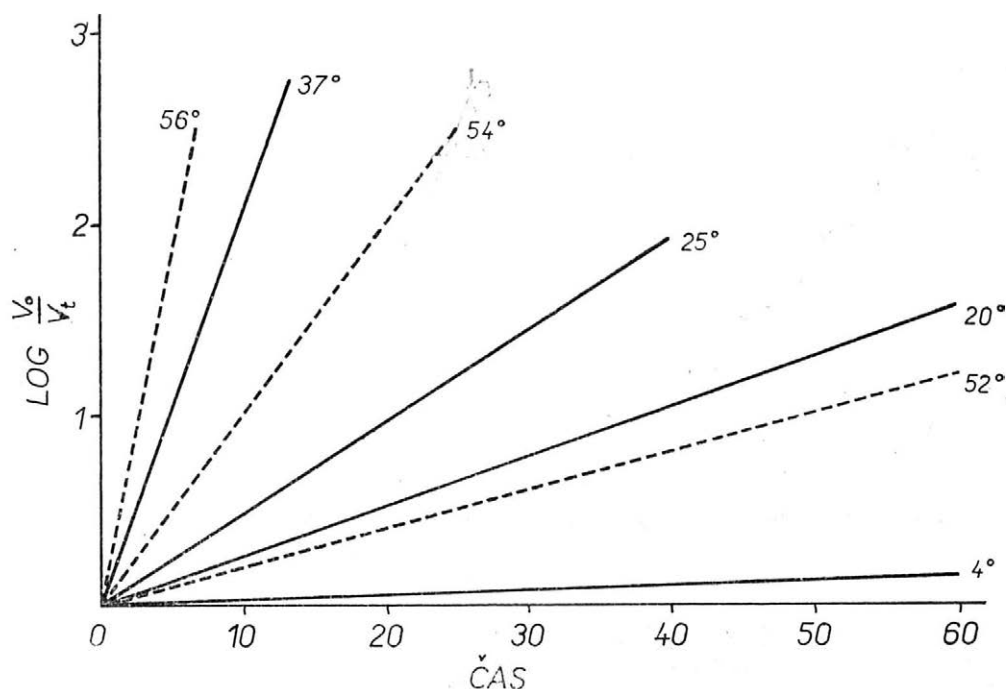
2. Inaktivace infekitivity viru infekční hepatitidy psů při 56 °C

použito k sestavení nejvhodnější inaktivační křivky při této teplotě a k výpočtu poločasu. Tento druh inaktivace byl zjištěn téměř u všech nižších teplot až do 47 °C. Křivky v tomto rozmezí teplot byly tedy jednofázové.

Naproti tomu je na obr. 2 zobrazena závislost infekitivity viru HCC při 56 °C. U tohoto druhu inaktivace, který se projevoval výrazněji u teplot vyšších (52 °C až 56 °C), není tato závislost v průběhu celé inaktivace jednofázová. Je zde zcela patrná dvoufázovost. V první fázi je průběh inaktivační křivky lineární a strmý, což znamená, že v této části dochází k rychlejší inaktivaci viru, kdežto v druhé fázi probíhá inaktivace podstatně pomaleji. Při takovém druhu inaktivace byla lineární regrese vypočítána pouze u první fáze. Zdá se, že u viru HCC je situace obdobná jako u ribovirů, kde byl při vyšších teplotách rovněž prokázán dvoufázový průběh inaktivace.

Vedle uvedených dvou teplot byly stejným způsobem studovány inaktivace i při dalších teplotách v rozmezí +4 °C až 56 °C. Doba jednotlivých odběrů vzorků se u různých teplot lišila. Při teplotách 54 °C a 56 °C jsme vzorky odebírali podle stopek každou 1 minutu, při 52 °C a 50 °C každých 20, popřípadě 45 minut, při 48 °C a 42 °C každých 5 a 10 hodin, při teplotách nižších v denních a vícedenních intervalech. Každá teplotní inaktivace viru byla sledována čtyřikrát až šestkrát a jednotlivé lineární regrese byly kombinovány. Těchto průměrných lineárních regresí, které byly rovněž lineární a signifikantní, bylo pak použito jako inaktivačních křivek, znázorněných na obr. 3. Tento graf ukazuje závislost poklesu infekitivity na teplotě, přičemž pokles infekitivity

je vyjádřen výrazem $\log \frac{V_o}{V_t}$, kde V_o je infektivita výchozí a V_t infektivita zjištěná při dané teplotě. Z toho také vyplývá, že při 56 °C dochází ke ztrátě infekitivity o 2 log, tj., že původní infektivita klesne na 1 % již za necelých 6 minut, zatímco např. při 37 °C dojde ke stejnému poklesu až za 10 dní a při 20 °C téměř za tři měsíce. Je třeba ještě dodat, že pokud se u některé křivky vyskytnou dvě fáze, je na obr. 3 znázorněna pouze přední část inaktivační křivky.



3. Inaktivace infekivity viru infekční hepatitidy psů při různých teplotách

———— = čas ve dnech
 ----- = čas v minutách

I. Poločasy a termodynamické parametry pro tepelnou inaktivaci infekivity viru infekční hepatitidy psů

t °C	$\frac{1}{T} \cdot 10^3$	Poločas (hod.) experimentální	Poločas (hod.) teoretický	k hod. ⁻¹	Aktivační energie $\Delta H^\ddagger$ kcal/mol	Aktivační entropie $\Delta S^\ddagger$ cal/mol/grad
4	3,610	—	2340			
20	3,413	278	276	$2,49 \cdot 10^{-3}$		
25	3,356	156	147	$4,46 \cdot 10^{-3}$		
33	3,268	52	56	$1,32 \cdot 10^{-2}$	22	1,4
37	3,226	36	36	$1,91 \cdot 10^{-2}$		
42	3,175	22	21	$3,10 \cdot 10^{-2}$		
46,7	3,128	—	12,30			
48	3,116	4,40	4,80	$1,57 \cdot 10^{-1}$		
50	3,096	0,87	1,10	$7,91 \cdot 10^{-1}$		
52	3,077	0,35	0,24	1,98	152	424
54	3,058	0,04	0,05	1,78		
56	3,040	0,01	0,01	4,95		

Označíme-li jako poločas $t_{\frac{1}{2}}$ dobu, za kterou klesla původní infektivita na polovinu, tj. o 0,3 log, pak můžeme s výhodou použít parametrů lineárních regresí k výpočtu poločasů při jednotlivých teplotách. Použijeme tu vztahu:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0,3}{b}, \text{ kde } t_{\frac{1}{2}} \text{ je poločas a } b \text{ absolutní hodnota směrnice.}$$

Tak např. inaktivační křivka na obr. 1 má rovnici $y = 4,90 - 0,22 x$, odkud $t_{\frac{1}{2}} = 1,36$ dní.

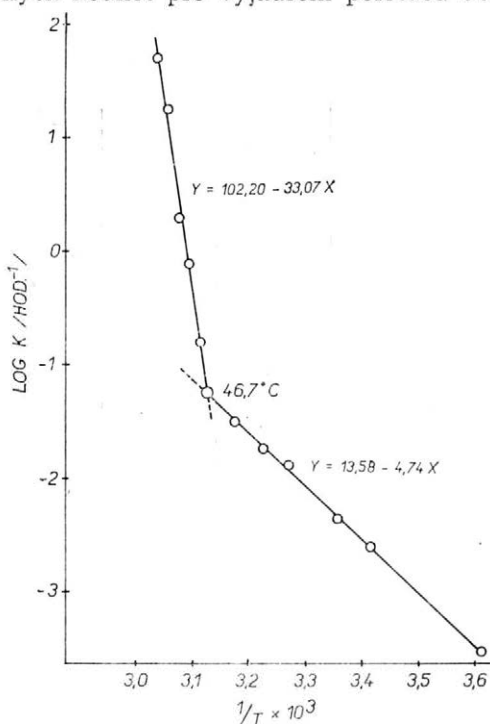
Podobným způsobem byly zpracovány inaktivační křivky u všech teplot a vypočítané poločasy, odvozené matematicky, byly převedeny na hodiny. Průměrné poločasy u všech sledovaných teplot jsou uvedeny v tab. I, kde jsou uvedeny i poločasy odvozené teoreticky výpočtem. V podstatě se hodnoty získané experimentálně značně blíží hodnotám odvozeným. Udané poločasy poukazují na velkou stabilitu a odolnost viru HCC vůči teplotám, zejména v oblasti teplot nižších. To potvrzuje ostatně i zkušenost, že infekční suspenze viru HCC se dá uchovávat při chladničkové teplotě $+4^{\circ}\text{C}$ několik týdnů bez znatelné ztráty infekтивности a na závadu není ani přechodné krátkodobé uložení infekční suspenze viru HCC z tkáňových kultur při laboratorní teplotě. Mimo to lze s výhodou použít značné stability viru při 37°C při neutralizačních testech, neboť poločas při této teplotě činí 36 hodin, tj. 1,5 dne.

2. TERMODYNAMICKÉ PARAMETRY PRO TERMÁLNÍ INAKTIVACI VIRU HCC

Protože termální inaktivace je monomolekulární reakcí, alespoň v počátečním průběhu, lze pro jednotlivé teploty vypočítat reakční konstanty z integrované formy rovnice prvního řádu: $k = \frac{2,303}{t} \log \frac{V_0}{V_t}$ kde t je čas V_0 a V_t infektivita viru v čase 0 a t . Včleněním obecných hodnot pro vyjádření poločasu do-

$$\text{staneme } k = \frac{0,691}{\text{poločas}}$$

K vyjádření empirického vztahu mezi reakční rychlostí a teplotou je možno použít Arrheniova grafického zobrazení závislosti logaritmu rychlostní konstanty na převrátné hodnotě absolutní teploty. Této závislosti je použito na obr. 4 pro termální inaktivaci viru HCC. Již při vynesení příslušných hodnot log k bylo zřejmé, že je závislost vyjádřena dvěma protínajícími se přímkami. Z hodnot, příslušejících oběma přímkám, byly vypočítány lineární regrese: pro oblast teplot nižších $y = 13,58 - 4,74 x$ se směrnici $b = -4,74$ a pro oblast teplot vyšších $y = 102,20 - 33,07 x$ se směrnici



4. Grafické znázornění závislosti log rychlostní konstanty k (hod^{-1}) na převrátné hodnotě absolutní teploty

b = -33,07. Vzájemným odečtením obou rovnic byl stanoven průsečík obou přímek, mající parametry $\log k = 0,75 - 2$ a $\frac{1}{T} 10^3 = 3,128$, tj. 46,7 °C.

Použitím směrnic obou přímek byla vypočítána aktivační energie podle vztahu $b = - \frac{\Delta H^+}{1,303 R}$, kde b je směrnice přímky, ΔH^+ aktivační energie a $R = 1,987$ cal/grad. Aktivační energie, takto vypočítaná, činí pro rozmezí teplot +4 °C až 46,7 °C 22 kcal/mol a pro rozmezí teplot 46,7 °C až 56 °C 152 kcal/mol.

Další termodynamickou veličinou, která byla při termální inaktivaci viru HCC sledována, je aktivační entropie ΔS^+ . Za tím účelem byla reakční konstanta k vyjádřena jako funkce aktivační energie a entropie:

$$\log k = 10,3 + \log T - \frac{\Delta H^+}{2,3 T R} + \frac{\Delta S^+}{2,3 R},$$

kde ΔH^+ je totožné s aktivační energií a ΔS^+ odpovídá příslušné změně entropie. Pro rozmezí teplot 4 °C až 46,7 °C činí aktivační entropie 1,4 cal/mol/grad a pro rozmezí 46,7 °C až 56 °C 424 cal/mol/grad.

DISKUSE

To, že vztah mezi reakční rychlostí inaktivace a teplotou není vyjádřen jedinou přímkou, nýbrž přímkami dvěma, navzájem se protínajícími, je zřetelným důkazem toho, že inaktivace viru HCC v rozsahu měřených teplot neprobíhá jednotně. Jde zřejmě o dva procesy, vyjádřené i různou aktivační energií a entropií. Jak je patrné z tab. II. k podobnému výsledku došla i řada dalších autorů. Již Woese (1960) poukázal na to, že aktivační energie stanovená

II. Aktivační energie a entropie pro tepelnou inaktivaci infekivity některých virů

Virus	Teploty nižší		Teploty vyšší		Průsečík °C	Autor
	$\Delta H^{+1)}$	$\Delta S^{+2)}$	ΔH^+	ΔS^+		
HCC	22	1	152	424	46,7	tato práce
Polio LSc	28	7	244	689	44	Dimmock a kol. (1967)
Polio MEF 1	27		202		47	French a kol. (1960)
Rhinovirus	19	-17	100	242	39	Dimmock a kol. (1967)
Slintavka	27		121		43	Bachrach a kol. (1957)
Slintavka	30-45	23-69	116-155	291-400	41-53	Ahl (1968)
ROUS sarcoma	20	-16	78		45	Dougherty (1961)
Blue tongue	8		50		46	Svehag (1963)
Cytomegalus	13		92		37	Krugman a kol. (1964)
Vakcinia	14					Sharp (1964)

¹⁾ = aktivační energie (kcal/mol)

²⁾ = aktivační entropie (cal/mol/grad)

pro vysoké teploty odpovídá aktivační energii při denaturaci bílkovin, zatímco na druhé straně považoval Ginoza a kol. (1964) nízkou aktivační energii při teplotách nižších za projev inaktivace kyseliny ribonukleinové. Průkaz správnosti těchto vývodů podal Dimmock (1967), který studoval D antigen viru *polio*, pomocí neutralizace a zjistil, že je při vyšších teplotách ničen, kdežto při teplotách nižších nikoliv. Mimo to ukázal, že ionty Mg nemají vliv na stabilitu virální kyseliny ribonukleinové, kdežto přítomnost iontů hořčíku nápadně zpozďuje přeměnu D antigenu v C antigen.

Koch (1960) uvádí, že při 54 °C je bílkovina viru *polio* denaturována, přičemž virální kyselina ribonukleinová zůstává neovlivněna. U viru slintavky a kulhavky je bílkovina viru při vyšších teplotách štěpena na podjednotky, ale ribonukleinová kyselina zůstává zachována (Brown a kol. 1963). K podobnému závěru dospěl i Dimmock (1967) při studiu ribonukleinové kyseliny viru *polio* a rhinoviru. Zjistil, že po grafickém vyjádření závislosti rychlostní konstanty na teplotě představuje ribonukleinová kyselina viru *polio* jedinou přímkou v průběhu nižších i vyšších teplot, mající ΔH^+ 31 kcal/mol a ΔS^+ 4 cal/mol/grad. Naproti tomu výchozí virus, z něhož byla ribonukleinová kyselina izolována, vykazoval přímkou lomenou, s průsečíkem při 44 °C. Oblast teplot nižších než 44 °C měla ΔH^+ 28 kcal/mol a ΔS^+ 7 cal/mol/grad. Úzký vztah termodynamických hodnot viru *polio* pro teploty nižší a jeho ribonukleinové kyseliny tak plně nasvědčuje tomu, že při nižších teplotách převládá inaktivace kyseliny nukleové, zatímco při vyšších teplotách denaturace bílkovin. Lze předpokládat, že obě reakce probíhají při všech teplotách souběžně, avšak při různých teplotách má vždy jedna z nich převahu, výjma teploty, kde se obě reakce kříží, tj. v průsečíku obou inaktivačních přímk.

Všechny uvedené studie byly provedeny u virů obsahujících kyselinu ribonukleovou a zejména u skupiny picornavirů. Jaké jsou poměry u deoxyvirů není dosud známo. Je pravděpodobné, že i zde bude při vyšších teplotách převládat inaktivace bílkovinné části viru, čemuž nasvědčuje i vyšší hodnota ΔH^+ (152 kcal/mol) i ΔS^+ (424 cal/mol/grad), které jsme zjistili u viru infekční hepatitidy psů a které jsou v souladu se stejnými termodynamickými veličinami u ribovirů. Krugman (1964) zjistil u lidského cytomegaloviru nízkou hodnotu aktivační energie, pouze 92 kcal/mol. Tato hodnota je však pouze přibližná, neboť ji autor odvodil jen ze dvou teplot. U dalšího deoxyviru, viru vakcinie, sledoval Sharp (1964) pouze teploty nižší a teplotu 56 °C.

Pro nižší teploty chybí zatím u deoxyvirů bližší vysvětlení. Termodynamické parametry inaktivace deoxyvirů uvedené Krugmanem nebo Sharpem (viz tab. II) jsou značně nízké. Námi zjištěné ΔH^+ = 22 kcal/mol i ΔS^+ = 1 cal/mol/grad jsou sice blízké hodnotám ribovirů, avšak jen z takového srovnání nelze dělat bližší závěry, dokud nebudou provedeny podrobnější srovnávací studie, např. s izolovanou virální deoxyribonukleovou kyselinou.

Technická spolupráce: Jana Kubíková, Ivana Štrosová, Eva Lorenzová.

Literatura

- AHL R., 1968, Untersuchungen zur Thermoinaktivierung des Maul- und Klauen-seuchen Virus. Arch. ges. Virusforsch. 24 : 361-386.
 BACHRACH H. L., BREESE S. S. Jr., CALLIS J. J., HESS W. R., PATTY R. E., 1957, Inactivation of foot-and mouth disease virus by pH and temperature changes and by formaldehyde. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 95 : 147-152.

- BROWN F., CARTWRIGHT B., STEWART D. L., 1963, The effect of various inactivating agents on the viral and ribonucleic acid infectivities of foot-and-mouth disease and on its attachment to susceptible cells. *J. Gen. Microbiol.* 31 : 179-186.
- DIMMOCK N. J., 1967, Differences between the thermal inactivation of picornaviruses at "high" and "low" temperatures. *Virology* 31 : 338-353.
- DITCHFIELD J., MACPHERSON L. W., ZBITNEW A., 1962, Association of a canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("Kennel Cough"). *Can. Vet. J.* 3 : 238-247.
- DOUGHERTY R. M., 1961, Heat inactivation of Rous sarcoma virus. *Virology* 14 : 371-372.
- FASTIER L. B., 1958, The survival of infectious canine hepatitis virus under various experimental conditions. *Vet. Rec.* 70 : 623-626.
- FRENCH R. C., ARMSTRONG R. E., 1960, Thermal inactivation of MEF 1 poliovirus. *Can. J. Microbiol.* 6 : 175-181.
- GINOZA W., HOELLE C. J., VESSEY K. B., CARWACK C., 1964, Mechanisms of inactivation of single-stranded virus nucleic acids by heat. *Nature* 203 : 606-609.
- JIRAN E., 1964, Infekční zánět jater psů (Rubarth). *Izolace a kultivace viru. Vet. Med. (Praha)* 9 : 267-272.
- KÄRBER G., 1931, Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 162 : 480-483.
- KOCH J., 1960, Influence of assay conditions on infectivity of heated poliovirus. *Virology* 12 : 601-603.
- KRUGMAN R. D., GOODHEART C. R., 1964, Human Cytomegalovirus thermal inactivation. *Virology* 23 : 290-291.
- PEREIRA H. G., HUEBNER R. J., GINSBERG H. S., van der VEEN J., 1963, A short description of the adenovirus group. *Virology* 20 : 613-620.
- SHARP D. G., SADHUKHAN P., GALASSO G. J., 1964, The slow decline in quality of vaccinia virus at low temperatures (37 °C to -62 °C). *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.* 95 : 811-814.
- SVEHAG S. E., 1963, Thermal inactivation of blue tongue virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 13 : 499-510.
- WOESE C., 1960, Thermal inactivation of animal viruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 83 : 741-751.
- YAMAMOTO T., 1966, Some physical and growth characteristics of a canine adenovirus isolated from dogs with laryngotracheitis. *Can. J. Microbiol.* 12 : 303-311.

Došlo dne 6. 3. 1969

ПЕТР Г., ЙИРАН Э. (Биовета Терезин, Чехословакия). Термическая инактивация вирусов инфекционного гепатита собак. *Вет. Мед. (Прага)* 14 (11) : 643-651, 1969.

Изучалась теплоустойчивость вирусов инфекционного гепатита собак из тканевых культур собачьих почечных клеток при pH 7,2. Вирус очень устойчивый, с полупериодами 100 дней, 11 дней и 1,5 дня при температурах 4 °C, 20 °C и 37 °C и с полупериодами 4,5 часа, 20 минут и 0,8 минуты при температурах 48 °C, 52 °C и 56 °C. Было установлено, что термическая инактивация инфекционности вирусов инфекционного гепатита собак протекает в диапазоне температур 4 °C и 56 °C в двух термодинамически различных реакциях, которые пересекаются при температуре 46,7 °C. Отвечающие активационные энергия и энтропия при температуре, не достигающей 46,7 °C, составляют 22 ккал/моль и 1,4 ккал/моль/град, а для температур, превышающих 46,7 °C, они равны 152 ккал/моль и 424 ккал/моль/град.

вирус инфекционного гепатита собак; термическая инактивация вирусов; активационная энергия и энтропия

PETR G., JIRAN E. (Bioveta Terezín, Czechoslovakia). *Thermal Inactivation of the Virus of Infectious Hepatitis of Dogs. Vet. Med. (Praha)* 14 (11) : 643-651, 1969.

The thermal stability of the infectious dog hepatitis virus from tissue cultures of dog kidney cells was studied at pH 7.2. The virus is highly stable: the half-life times are 100 days, 11 days, and 1.5 day (at temperatures of 4 °C, 20 °C, and 37 °C)

4.5 hours, 20 min., and 0.8 min. (at temperatures of 48 °C, 52 °C, and 56 °C). It was observed that the inactivation of the infectivity of the infectious dog hepatitis virus requires temperatures ranging from 4 °C to 56 °C; the thermal inactivation takes place as two thermodynamic reactions which cross each other at 46 °C. The corresponding energy of activation and entropy of activation is 22 kcal/mol and 1.4 cal/mol/deg. for temperatures lower than 46.7 °C, and 152 kcal/mol and 424 cal/mol/degree for temperatures higher than 46.7 °C.

virus of infectious hepatitis of dogs; thermal inactivation of the virus; energy of activation and entropy of activation

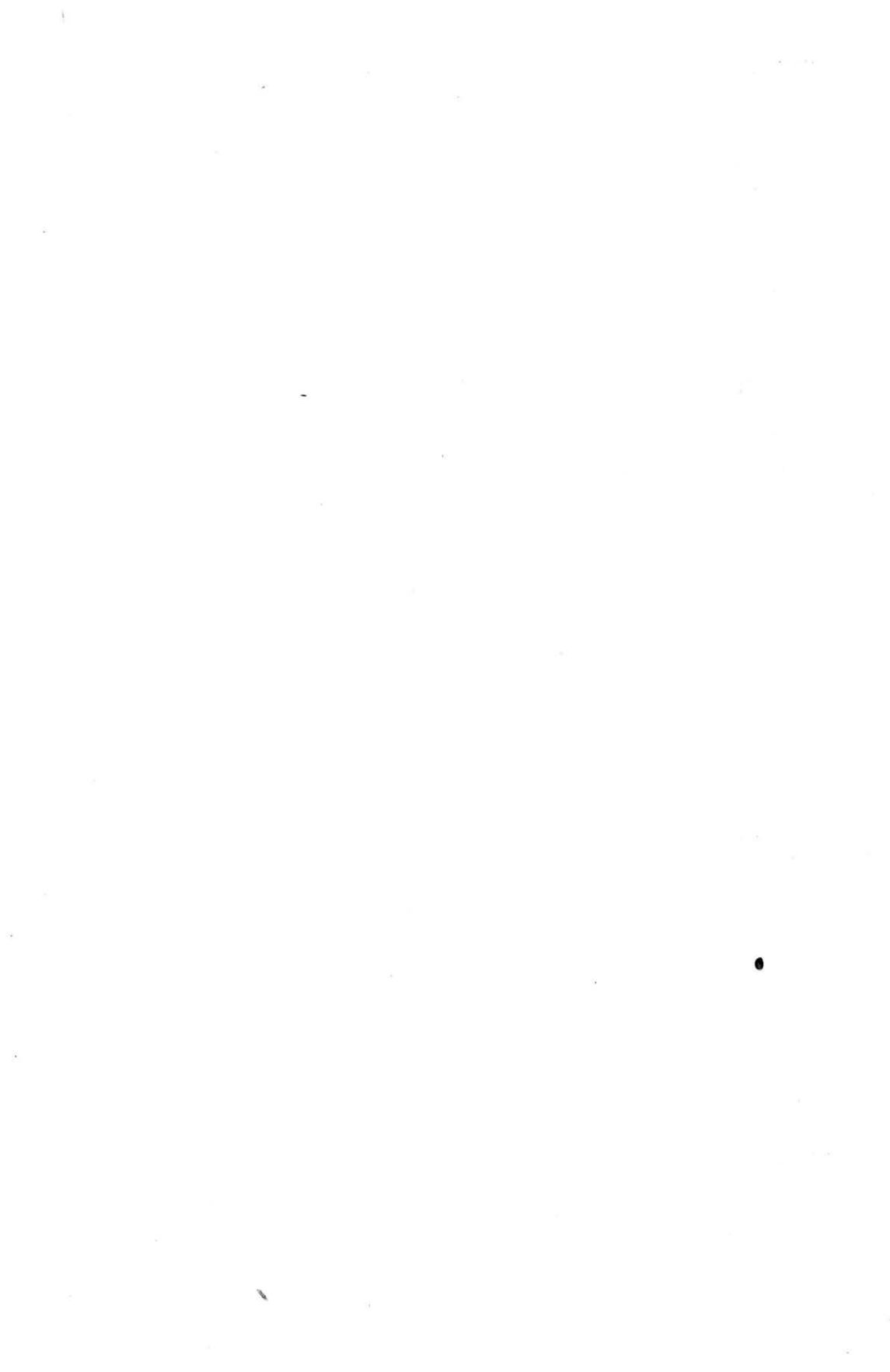
PETR G., JIRAN E. (Bioveta Terezín, Tschechoslowakei). *Virusinaktivierung der Infektionshepatitis bei Hunden durch Wärme*. Vet. Med. (Praha) 14 (11) : 643-651, 1969.

Es wurde die Virusthermostabilität der Infektionshepatitis bei Hunden aus den Gewebekulturen der Hundenierenzellen bei pH 7,2 studiert. Der Virus ist sehr stabil mit den Halbzeiten von 100 Tagen, 11 Tagen und 1,5 Tage bei den Temperaturen 4 °C, 20 °C und 37 °C und mit den Halbzeiten von 4,5 Stunden, 20 Minuten und 0,8 Minuten bei Temperaturen von 48 °C, 52 °C, 56 °C. Es wurde ermittelt, daß die Inaktivierung der Virusinfektivität der Infektionshepatitis bei Hunden mittels Wärme verläuft in einem Temperaturabstand von 4 °C und 56 °C in zwei thermodynamisch verschiedenen Reaktionen, die sich bei 46,7 °C kreuzen. Die entsprechende Aktivierungsenergie und Aktivierungsentropie macht für die Temperaturen unter 46,7 °C 22 kcal/mol und 1,4 cal/mol/grad und für Temperaturen über 46,7 °C 152 kcal/mol und 424 cal/mol/grad.

Virus der Infektionshepatitis bei Hunden; thermische Virusinaktivierung; Aktivierungsenergie und Aktivierungsentropie

Adresy autorů:

RNDr. Gustav Petr, MVDr. Eduard Jiran, CSc., Bioveta, Terezín
Reditel: MVDr. Rudolf Dombek



Corba J.: Účinek tetramisolu na oftalmohelmintry hovädzieho dobytku <i>Thelazia rhodesi</i> (Desmarest 1827)	601
Daněk J., Ševčík B.: Anthelmintická aktivita vývojových chemických látek zjišťovaná na modelovém parazitu <i>Nippostrongylus braziliensis</i>	607
Ševčík B., Dvořák M., Plíšek K.: Hladiny chloramfenikolu v krevním séru telat, prasat a koní po i. m. aplikaci injekčního roztoku	617
Šťavíková M.: Použití indigokarmínu k detekci streptomycinu a chloramfenikolu při intramamární aplikaci jako účinná ochrana mlékáren a spotřebitele před mlékem znečištěným antibiotiky	625
Sova Z., Jícha J., Koudela K., Houška J.: Stanovení aktivity kyselé fosfatázy (ACP) u kohoutků plemene leghornka bílá v časně postinkubační ontogeneze	637
Petr G., Jiran E.: Inaktivace viru infekční hepatitidy psů teplem	643

СОДЕРЖАНИЕ

Чорба Й.: Воздействие тетрализол на офтальмогельминты крупного рогатого скота <i>Thelazia rhodesi</i> (Desmarest 1827)	605
Данек Й., Шевчик Б.: Антителминтическая активность опытных химикатов, определяемая на модельных паразитах <i>Nippostrongylus braziliensis</i>	614
Шевчик Б., Дворжак М., Плишек К.: Уровень хлорамфеникола в сыворотке крови телят, свиней и лошадей после внутримышечного введения инъекционного раствора	622
Шťавикова М.: Применение индигокармина для определения наличия стрептомицина и хлорамфеникола при внутримаммарном применении как действенная охрана молочных заводов и потребителей против молока, загрязненного антибиотиками	634
Сова З., Йиха Й., Коудела К., Гоушка Й.: Определение активности кислой фосфатазы (ACP) у петушков породы леггорн белый в период раннего послепоникубационного онтогенеза	641
Петр Г., Йиран Э.: Термическая инаktivация вирусов инфекционного гепатита собак	650

CONTENT

Corba J.: The Effect of Tetramisol on the Ophthalmohelminths of Cattle, <i>Thelazia rhodesi</i> (Desmarest 1827)	605
Daněk J., Ševčík B.: The Anthelmintic Effect of Developmental Chemical Compounds Investigated in the Model Parasite <i>Nippostrongylus braziliensis</i>	615
Ševčík B., Dvořák M., Plíšek K.: The Chloramphenicol Level in the Blood Serum of Calves, Pigs, and Horses after i. m. Application of the Injection Liquid	622
Šťavíková M.: Intramammary Application of Indigo Carmine for the Detection of Streptomycin and Chloramphenicol as an Effective Protection of Dairies and Consumers from Milk Polluted with Antibiotics	635
Sova Z., Jícha J., Koudela K., Houška J.: The Determination of the Effect of Acidic Phosphatase (ACP) in the Cockerels of the White Leghorn Breed in an Early Post-incubation Ontogenesis	642
Petr G., Jiran E.: Thermal Inactivation of the Virus of Infectious Hepatitis of Dogs	650

INHALT

Corba J.: Wirkung des Tetramisols auf die Ophthalmohelminthen <i>Thelazia rhodesi</i> (Desmarest 1827)	606
Daněk J., Ševčík B.: Anthelminthika-Aktivität chemischer Entwicklungsstoffe, welche auf dem Modellparasit <i>Nippostrongylus braziliensis</i> festgestellt wird	615

- Sevčík B., Dvořák M., Plíšek K.: Chloramphenicolspiegel im Kälber-, Schweine- und Pferdeblutserum nach i. m. Applikation der Injektionslösung 623
- Šťavíková M.: Benutzug des Indigokarmis zur Detektion des Streptomycins und Chloramphenicols bei intramammärer Applikation als wirksamer Schutz der Molkereien und Konsumenten vor mit Antibiotika verunreinigter Milch 635
- Sova Z., Jícha J., Koudela K., Houška J.: Bestimmung der Aktivität der saueren Phosphate (ACP) bei weißen Leghornhähnchen in der frühen Postinkubationsontogenese 642
- Petr G., Jiran E.: Virusinaktivierung der Infektionshepatitis bei Hunden durch Wärme 651

TABLE DES MATIÈRES

- Corba J.: Effet de tétramisol sur les ophtalmohelminthes du cheptel bovin *Thelasia rhodesi* (Desmarest 1827) (res. An/605, Al/606).
- Daněk J., Ševčík B.: Activité anthelminthique des substances chimiques d'évolution, vérifiée sur le parasite modèle *Nippostrongylus braziliensis* (res. An, Al/615).
- Sevčík B., Dvořák M., Plíšek K.: Niveaux de chloramphénicol dans le sérum sanguin des veaux, des porcs et des chevaux à la suite de l'application intramusculaire d'une solution d'injection res. An/622, Al/623).
- Šťavíková M.: Emploi de l'indigocarmin à la détection de streptomycine et chloramphénicol lors de l'application intramammaire, en tant que protection efficace des laiteries et du consommateur contre le lait pollué par les antibiotiques (res. An, Al/635).
- Sova Z., Jícha J., Koudela K., Houška J.: Détermination de l'activité de la phosphatase acide (ACP) chez les coquelets de la race Leghorn blanche dans l'ontogenèse postincubatoire précoce (res. An, Al/642).
- Petr G., Jiran E.: Inactivation du virus de l'hépatite infectieuse des chiens par la chaleur (res. An/650, Al/651).