

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

✓
12

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

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDELSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Rídí 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 Ho-
lub, 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
studie, rozbor a vědecká pojednání o vyřešených úkolech
výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav
vědeckotechnických informací. Vychází měsíčně. Redakce:
Praha 2, Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné
Kčs 120,-.

■
Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзо-
ры, анализы и научные статьи о разрешенных заданиях по науч-
ному исследованию в области ветеринарной медицины. Издаёт
Институт научно-технической информации. Выход в свет ежемес-
ячно. Редакция Прага 2, Слезска 7.

■
The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA published
studies, analyses and scientific treatises about the solved
research tasks in the line of the veterinary medicine. 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.

PRŮKAZ VIRU IBR V SOUVISLOSTI S AKUTNÍM RESPIRAČNÍM ONEMOCNĚNÍM TELAT A MLADÉHO SKOTU

J. Menšík, V. Rozkošný

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

MENŠÍK J., ROZKOŠNÝ V. *Průkaz viru IBR v souvislosti s akutním respiračním onemocněním telat a mladého skotu.* Vet. Med. (Praha) 14 (12) : 653-664, 1969.

Z případů akutních vzplanutí respiračního onemocnění telat, které se vyznačovalo náhlým vznikem, vysokými teplotami a 100% morbiditou u telat v napadeném odchovném zařízení, byly na primárních tkáňových kulturách z telecích ledvin a telecích varlat izolovány dva kmeny viru infekční bovinní rhinotracheitidy — IBR (R 6 a M 13). Oba uvedené kmeny byly identifikovány jako kmeny sérologicky shodné s referenčním kmenem IBR-V-25; oba se ukázaly patogenní pro telata, u nichž vyvolaly po experimentální, intranazální a intratracheální infekci onemocnění, shodné s onemocněním v terénu. Signifikantní vzestup virusneutralizačních protilátek a izolace viru z respiračního traktu pokusných telat za 3 až 17 dní po infekci potvrzují význam viru IBR v etiologii respiračních infekcí skotu v ČSSR.

infekční bovinní rhinotracheitida; izolace a identifikace viru; průběh onemocnění; experimentální přenos

Jako infekční bovinní rhinotracheitida (IBR) je označováno relativně nové onemocnění skotu, které se poprvé objevilo v USA kolem r. 1950 (McIntyre 1954, Schroeder a Moys 1954), a jehož virová etiologie byla potvrzena v roce 1956 (Madin a kol. 1956, York a kol. 1957).

Další zprávy poukazují na značné rozšíření nákazy nejen v USA (McKercher a kol. 1957, Gillespie a kol. 1957, Chow 1961, McKercher a Wada 1964), v Kanadě (Greig 1961, Chamberland a kol. 1963), v Japonsku (Yamada a kol. 1964), ve velké Británii (Darbyshire a kol. 1962, Dawson a kol. 1962), ale i v západním Německu (Gründer a kol. 1960, Liess a kol. 1960), v Maďarsku (Domán a Fodor 1961) a v Itálii (Moretti a kol. 1964).

Skutečnost, že virus IBR je totožný s původcem klinicky zcela rozdílného onemocnění — infekční pustulární vulvovaginitidy (IPV) (Gillespie a kol. 1959), posunuje společnou historii obou nákaz více než o 100 let zpět (Röhner 1967).

IBR byla klinicky charakterizována původně jako mírné až těžké onemocnění horních dýchacích cest se čtyřdenní až šestidenní inkubační dobou, vysokými teplotami 40 až 41,7 °C, ztrátou chuti a depresí (McIntyre 1954). Bližší poznání biologie viru, který je dnes zařazován do skupiny herpesvirů a je podobný lidskému viru *herpes simplex*, ukázalo, že infekce virem IBR vyvolává onemocnění, které se manifestuje různými klinickými příznaky (York 1968).

Byly popsány vulvovaginitidy (Kendrick a kol. 1958), keratokonjunktivitidy (Hughes a kol. 1964), konjunktivitidy (Plummer 1960), encefalitidy (Barenfus a kol. 1963, Johnston a kol. 1962, Webster a Manktelow 1959), i aborty (McKercher a Wada 1964, Sattar a kol. 1967); nechybí ani údaje o izolaci viru v souvislosti s enteritidou telat (Gratzek a kol. 1966, Chennekatu a kol. 1966).

Během studia virových respiračních infekcí skotu jsme se v některých chovech setkali s akutním onemocněním telat a mladého skotu, které připomínalo infekční bovinní rhinotracheitidu.

KLINICKÉ PŘÍZNAKY A PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ NÁLEZ

Lokalita Tr — Velkokapacitní teletník pro 1200 telat byl doplňován telaty z určitého omezeného počtu farem. Respirační onemocnění se v teletníku vyskytovalo stacionárně, mělo mírný, spíše chronický průběh bez vážnějších komplikací. V červnu a v červenci 1968 pro nedostatek telat z tradiční oblasti byla telata dovážena i z jiných vzdálenějších okresů. Hned při prvním smíšeném zástavu „cizích“ zvířat vzplanula enzootie akutních těžkých pneumonií, komplikovaná průjmy, s vysokými teplotami, nechutenstvím, rychlou ztrátou kondice, s následnou zakrslostí a nutnými porážkami. Vedle těžkého, záchvatového kaše byly hlavním příznakem sérozní až hlenovité výtoky z nosu a sérozní výtoky z očí.

Nejtěžší stav byl pozorován u telat tři až šest měsíců starých. Všeobecná skleslost a malátnost byla provázena těžkým, záchvatovým vlhkým kašlem a hojnými výtoky z nosu a očí. Nemocnost byla v této věkové kategorii 100%. Ve skupině mladších telat, ustájených v karanténě, byly příznaky respiračního onemocnění s konjunktivitidou a výtoky z nosu pozorovány jen asi u 50% zvířat.

Pitvou poražených a uhynulých telat jsme zjistili bronchopneumonie různého rozsahu, hlenohnisavý exsudát v trachei a bronších, silné překrvení sliznice nosní s hlenohnisavým výtokem.

Lokalita P — je výkrmna pro 30 kusů skotu od 2 do 12 měsíců stáří. 4. 1. 1969 vzniklo náhle ve stáji u všech kusů onemocnění, projevující se kašlem, teplotou 41 až 42 °C, nechutenstvím, těžkou apatií a somnolencí. Kašel byl suchý, těžký, záchvatový, u některých zvířat značně vyčerpávající. Dva kusy byly nutně poraženy.

Při vyšetření, uskutečněném 7. 1. 1969, se již celkový stav zvířat viditelně zlepšil; teploty 40 až 41 °C byly zjištěny jen ojediněle a kašel byl mírnější. U většiny zvířat byly pozorovány konjunktivitidy s hojným sérozním výtokem z očí a séro-mucínózní výtoky z nosu. U některých kusů byla sliznice ventrální části otvorů nosních silně zarudlá.

Pitvou poraženého býka 8 měsíců starého byla zjištěna rozsáhlá pneumonie v předních lalocích plicních, zvětšené mízní uzliny mediastinální i bronchiální, místy zarudnutí, až krváceniny na sliznici tracheální, která byla pokryta hustým hlenem a difúzní zarudnutí sliznice nosní v celém rozsahu. Ostatní orgány byly beze změn.

MATERIÁL A METODIKA

K virologickému vyšetření jsme odebírali z živých zvířat pomocí suchých vatových tamponů vzorky sekretu očního a nosního, z poražených nebo z uhynulých zvířat pak vzorky sliznice nosní, tracheálního a bronchiálního hleny, plic, mízních uzlin plicních, tonsil, sleziny a jater. Vzorky jsme skladovali při teplotě –60 °C až do dne vyšetření.

10% suspenze orgánů v mediu H — O (Hanksův roztok bez séra) a vzorky výtěrů nosních, získané propráním vatových tamponů v mediu H — O, byly ještě před přidáním antibiotik vyšetřeny na mykoplazmata očkováním v tekutých a pevných půdách pro pěstování mykoplazmat (Menšík a kol. 1968). Suspenze byly pak centrifugovány 20 min. při 3000 ot./min. a supernatant z každého vzorku byl po přidání antibiotik (500 j. penicillinu a 500 γ streptomycinu) uložen v lednici při +4 °C dvě hodiny.

Tkáňové kultury (TK) primárních telecích ledvin (TL) a telecích varlat (TV) byly připravovány trypsinací z jatečných telat tři až čtyři týdny starých. Jako růstové medium jsme používali Hanksův roztok s 20 % inaktivovaného telecího séra (H 20), 0,5 % laktalalbuminhydrolyzátu (LAH) s přidávkou antibiotik (200 j. penicilinu a 200 γ streptomycinu na 1 ml). Buňky TL vytvořily souvislý porost ve zkumavkách za tři až pět dní, buňky TV za dva až tři dny inkubace při 37 °C. Po odstranění růstového media a vypláchnutí zkumavek udržovacím médiem H — O, doplněným 0,5 % LAH, jsme holý buněčný porost každé ze čtyř zkumavek inokulovali 0,1 ml suspenze. Po adsorbci, trvající jednu hodinu při 37 °C, jsme zkumavky doplnili udržovacím médiem a inkubovali při 37 °C pět až sedm dní.

Kultury jsme denně prohlíželi pod mikroskopem a pátrali po cytopatickém efektu (CPE). Pro další pasáž byla použita tkáňová tekutina z předchozí pasáže, bez ohledu na to, zda byl CPE zjištěn či nikoliv; po šesti slepých pasážích se negativní materiály vyřazovaly.

Izolované kmeny, které vyvolávaly tvorbu charakteristického CPE, byly pak sérologicky identifikovány a byla ověřena jejich patogenita pro telata po experimentální infekci. Pro sérologické účely byly kmeny pěstovány na stabilní linii buněk telecích ledvin (TL 72).*)

Jako prototypový kmen viru IBR byl použit kmen IBR-LA, Mc Kercher, Dawis, USA, uložený ve Sbírce zoopatogenních mikroorganismů na VÚVL v Brně pod označením V-25.***) Kmen byl pasážován na TK telecích varlat a prodělal v naší laboratoři celkem šest pasáží.

HYPERIMUNIZACE KRÁLÍKŮ

2 ml infekční tkáňové tekutiny, obsahující 10⁵ až 10⁶ TCID₅₀ viru/0,1 ml, bylo aplikováno i. v. králíkům v tří až čtyřdenních intervalech po dobu šesti týdnů. Králíci byli vykrveni sedm dní po poslední injekci. Získaná kmenově specifická antiséra, rozplněná a zatavená v ampulích, byla skladována při teplotě —60 °C.

VIRUSNEUTRALIZAČNÍ TEST

Hyperimunní králíčí antiséra byla inaktivována 30 min. při 56 °C a vyšetřena v křížovém virusneutralizačním testu.

Sériová dvojnásobná ředění séra byla smíchána se stejným množstvím infekční tkáňové tekutiny, obsahující 100 TCID₅₀ testovaného kmene v 0,1 ml tekutiny. Směs viru a séra byla ponechána dvě hodiny při pokojové teplotě a pak očkovaná v množství 0,2 ml do zkumavek s dobře narostlou tkáňovou kulturou stabilní linie TL 72. Pro každé ředění séra byly očkovány čtyři zkumavky. Titr séra byl vyjádřen jako reciproká hodnota toho ředění, které ještě neutralizovalo virus alespoň ve dvou ze čtyř očkovaných zkumavek.

EXPERIMENTÁLNÍ PŘENOS

Šest zdravých telat tři až pět týdnů starých, která byla nakoupena z lokality, kde se respirační ani střevní infekce telat nevyskytují, bylo ustájeno v izolaci a denně po dobu sedmi dní klinicky vyšetřováno. V séru telat před infekcí nebyly prokázány VN protilátky proti viru IBR. Každému z pokusných telat bylo aplikováno 10 ml infekční tkáňové tekutiny intratracheálně nebo intranazálně, kontrolní tele dostalo 10 ml neinfekční tkáňové tekutiny intratracheálně. Telata byla pak denně sledována a podrobně byl vyšetřován jejich zdravotní stav. Za tři a sedm dní po infekci byla některá z nich poražena.

*) Linii TL 72 jsme získali od dr. Hubíka z Biovety Terežín

**) Kmen byl získán od G. Wizigmanna, Universität München, z 30. pasáže na TL

HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Vzorky plic, průdušnice, nosní sliznice, tonsil, mizních uzlin plicních, sleziny a jater byly fixovány v 10% formalinu a Carnoyově roztoku a pak zpracovány běžnou histologickou technikou. Řezy byly barveny hematoxylin-eosinem a metylzelení-pyroninem.

POKUSY O REIZOLACI VIRU

Vzorky sekretů nosních a očních a vzorky orgánů z experimentálně infikovaných telat jsme zpracovali stejně jako vzorky z terénu a vyšetřovali jsme je na přítomnost viru očkováním na TK telecích varlat ve čtyřech pasážích.

SÉROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Párové vzorky krevních sér telat, která přežila 21 dní po experimentální infekci, byly vyšetřeny VN testem proti 100 TCID₅₀ viru.

VÝSLEDKY

Z 15 vzorků nosních výtěrů, tracheálního hleny a plic telat z lokality Tr byl izolován zárodek *Mycoplasma bovirhinis* v osmi případech, materiály z lokality P byly na mykoplazmata negativní.

Z celkového počtu 40 materiálů (plíce, mizní uzliny plicní, sliznice a hlen tracheální, vzorky nosního hleny a výtěrů očních, sliznice nosní, tonsily a mezenterální mizní uzliny) z obou sledovaných lokalit, vyšetřených na tkáňových kulturách, jsme v šesti případech potvrdili přítomnost cytopatogenních agens (tab. I).

V první pasáži na TK, TL a TV se objevovaly na dosud souvislém buněčném porostu shluky drobných zakulacených buněk, které jako hrozny ulpávaly na buněčné vrstvě. Později se vytvořila v buněčném porostu drobná i větší oka, která byla lemována několika řadami zakulacených buněk. Jednotlivá ložiska později splývala ve větší souvislé plochy, kde byl již rozpad porostu zřejmý a zbytky kulatých buněk ve shlucích tvořily nepravidelnou síť místo dřívější pravidelné buněčné struktury. V konečných fázích došlo k úplné destrukci porostu s nepravidelnými shluky kulatých buněk (obr. 1–3). V preparátech tkáňové kultury, fixovaných a barvených hematoxylin-eosinem, byly za 12 hodin po infekci patrné intranukleární inkluze Cowdryho typu, charakteristické pro skupinu herpetických virů (obr. 4).

Ve vyšších pasážích při očkování neředěné suspenze vytvářel se rozsáhlý CPE za 48 hodin, později již za 24 hodiny po infekci. Rychlým nástupem i charakterem CPE připomínaly izolované kmeny prototypový referenční kmen IBR-V-25. Z dalších skupin byl vybrán z lokality Tr kmen izolovaný z očního výtěru telete (R 6) a z lokality P kmen izolovaný z nosní sliznice poraženého býka (M-13).

V křížovém VN testu byly oba kmeny určeny jako antigenně příbuzné s referenčním kmenem V-25 viru IBR (tab. II).

EXPERIMENTÁLNÍ PŘENOS

V pokusech o přenos onemocnění jsme infikovali kmenem R 6 dvě telata (č. 1 a 2) intranazálně, tele č. 3 intratracheálně a další dvě telata (č. 4 a č. 5) byla infikována kmenem M 13 intratracheálně; kontrolnímu teleti č. 6 byla intratracheálně aplikována negativní suspenze tkáňové kultury. Jednotlivé skupiny telat byly drženy v přísné izolaci.

I. Přehled o izolaci viru IBR na tkáňových kulturách telecích ledvin a telecích varlat

Lokalita	Vyšetřený materiál	Pasáž	TL		TV	
			CPE*	dny inkuba-ce	CPE	dny inkuba-ce
Tr	oční výtěr	1	0	6	0	6
		2	0	6	0	6
		3	0	6	++	3
		4	++	4	+++	2
		5	+++	2	+++	1
		6	+++	2	+++	1
P	nos. sliznice	1	++	4	++	2
		2	+++	4	+++	2
		3	+++	3	+++	1
	mízní uzliny plicní	1	+++	5	++	2
		2	negat.	6	++	1
		3	++	2	+++	1
	tonsily	1	+++	5	++	2
		2	negat.	6	++	2
		3	++	2	++	1
	tracheální hlen	1	++	3	nevyšetřeno	
		2	+++	6		
		3	+++	4		
	slezina	1	++	5	++	2
		2	+++	6	+++	1
		3	+++	1	+++	1

* stupeň cytopatického efektu

+ = změny odpovídají obr. 2

++ = změny odpovídají obr. 2 a 3

+++ = změny odpovídají obr. 3

U telat č. 1 a 2 se příznaky celkového onemocnění, skleslost a malátnost, zvýšená frekvence dechu a pulsu a teplota 40,4 až 40,9 °C objevily již za 24 hodiny po infekci. Za 48 hodin se frekvence dechu a pulsu ještě zrychlila a dostavil se bolestivý, namáhavý, suchý a ostrý kašel a hojný hlenovitý výtok z nosu. Onemocnění vrcholilo čtvrtý den po infekci teplotou 41,4 až 41,8 °C, rychlým povrchním a namáhavým dechem, celkovou slabostí, apatií a nechutenstvím. Hojný hlenovitý výtok z nosu (obr. 5) byl doprovázen sérozním výtokem z očí. Kašel se stal velmi namáhavý a bolestivý; bolestivost byla zjištělná i při palpaci na hrtan a tracheu. U telete č. 2 se postupně vyvíjela oboustranná bronchitida a bronchopneumonie, sliznice mulce a sliznice nosní byla silně zarudlá a na bázi dutiny nosní se objevily červené povrchové léze, pokryté krupózními membránami. Zdravotní stav se rychle zhoršoval a ve stavu celkové slabosti a vyčerpání bylo tele šest dní po infekci poraženo.

Zdravotní stav telete č. 1 se do osmi dní po infekci (p. i.) upravil a celkové

II. Srovnání izolovaných kmenů a sbírkového kmene IBR - V - 25 (LA) v křížovém virusneutralizačním testu

Antiséra Kmeny	IBR - V - 25	R - 6	M 13
Sbírkový kmen IBR - V - 25	1 : 16	1 : 32	1 : 32
R - 6	1 : 16	1 : 64	1 : 16
M - 13	1 : 32	1 : 64	1 : 32

příznaky postupně doznávaly. Hlenohnisavý nosní výtok se do 20. dne změnil v hlenovitý a po 30 dnech zcela přestal.

U telete č. 3 se klinické příznaky objevily za tři dny po infekci. Zvýšení teploty na 40,3 až 40,8 °C bylo jen krátkodobé a také ostatní příznaky — nechutenství, apatie a zrychlená frekvence dechu a pulsu se pátý den po infekci zmírnily. Osmý den však teplota znovu vystoupila na 41,3 °C, celkový stav zvířete se zhoršil, dostavila se třesavka a suchý bolestivý kašel. Zvlášť výrazné byly příznaky respirační, *rhinitis* a *tracheitis*. Hojný mucinózní výtok z nosu obsahoval vločky hnisu a na bázi v otvorech nosních se objevily eroze. Při odběru tamponových výtěrů z nosních dutin se dostavilo mírné krvácení. Za 17 dní po infekci bylo tele ve špatném výživném stavu poraženo.

Obě telata infikovaná kmenem M 13 onemocněla za dva dny po infekci. Teplotní reakce byla mírnější než u telat infikovaných kmenem R 6. Celkové příznaky byly však nápadné. U telat se objevil průjem, apatie, slabost a nechutenství, provázené

III. Teplotní reakce telat po experimentální infekci

Dny po in- fekci	Telata infikovaná kmenem R - 6						Telata infikovaná kmenem M - 13				Tele kontrolní	
	č. 1		č. 2		č. 3		č. 4		č. 5		č. 6	
	teploty		teploty		teploty		teploty		teploty		teploty	
	ráno	večer	ráno	večer	ráno	večer	ráno	večer	ráno	večer	ráno	večer
0	39,2	38,8	38,6	38,9	38,1	38,3	37,9	38,2	38,6	38,7	38,8	38,9
1	39,9	39,0	39,0	39,3	38,1	38,9	38,4	40,0	38,5	39,2	38,7	39,0
2	39,5	40,3	41,0	41,4	38,8	39,2	40,6		40,3	40,6	38,8	38,8
3	40,4	41,3	41,2	41,6	40,3	40,9	poraženo		40,4	40,6	38,7	39,0
4	41,3	41,6	40,3	41,1	39,9	40,2			39,7	39,9	38,8	39,0
5	40,2	40,6	40,6	40,4	38,7	39,2			38,6	39,2	38,6	38,9
6	39,5	39,9	poraženo		39,8	39,1			38,0	38,6	38,7	38,9
7	39,1	39,8			40,0	41,3			39,0	38,9	poraženo	
8	39,5	40,0			40,4	40,7			38,4	39,0		
9	38,2	39,5			38,2	39,2			38,6			
10	38,4	38,3			38,2	40,0			38,8	39,0		
11	38,9	39,0			39,2	39,8			38,7	39,0		
12	39,2	39,3			38,6	38,6			38,8			
13	38,9	39,1			39,0	40,0						
14	38,8	39,0			39,2	39,9						
15	38,8	39,1			38,8	38,6						
16	38,6	39,0			38,6	38,9						
17					36,6	poraž.						

třesavkou. U telete č. 4 byl již třetí den po infekci stav kritický a vyznačoval se celkovou slabostí a potížemi dýchacími. Objevil se i hojný sérozní výtok z nosu. Čtvrtý den bylo tele před uhynutím vykrveno.

U telete č. 5 poklesla pátý den po infekci teplota na normál a do 14 dní vymizely postupně i ostatní příznaky. Kontrolní tele, infikované negativní tkáňovou suspenzí, neonemocnělo. Teplotní reakce všech pokusných telat je patrná z údajů v tab. III.

PITEVNÍ NÁLEZ

U telete č. 2, usmrceného za šest dní po infekci, byla silně překrvená a edematózní sliznice nosní pokryta hojným množstvím hleny, místy se objevily i krváceniny. Ojedinelé krváceniny byly zjištěny i na sliznici trachee a hrtanu. V apikálních lalocích byla tmavě červená, různě velká zánětlivá ložiska, ostře ohraničená od neporušené plicní tkáně (obr. 6). Mízní uzliny byly zvětšené, překrvené, edematózní, na řezu šfavnaté, ostatní orgány byly beze změn.

Patomorfologické změny v horních cestách dýchacích telete č. 3 byly mnohem výraznější. Sliznice nosní byla silně překrvená a pokrytá žlutozeleným hustým sekretem a fibrinózními nálepy (obr. 7); po jejich sloupnutí zůstaly zarudlé plošné povrchové léze, ohraničené krupózním valem. Podobné léze byly i na sliznici nosní přepážky a na sliznici epiglotis. Sliznice trachee byla edematózní, s drobnými krváceninami a hustým hlenovitým výpotkem. V plicích byla rozsáhlá pneumonická lo-

IV. Izolace viru IBR z telat experimentálně infikovaných na tkáňových kulturách telecích varlat

Tele číslo	Druh vyšetřenoého materiálu	Odběr za dny po infekci	Výsledek kultivace		
			pasáž	CPE	za dny po infekci TK
1	nosní výtěr	3	1	+	2
	oční výtěr	3	2	+	3
2	oční výtěr	3	2	+	3
	nosní výtěr	3	2	+	1
	sliznice nosní	6	2	+	1
	sliznice tracheální	6	2	+	1
	tonsily	6	2	+	1
3	nosní výtěr	5	3	+	2
	oční výtěr	12	2	+	1
	sliznice tracheální	17	3	+	1
	slezina	17	3	+	1
4	mízní uzliny plicní	3	2	+	2
	plice	3	2	+	3
	sliznice tracheální	3	2	+	2
	krev	3	2	+	3
	slezina	3	2	+	1
	sliznice nosní	3	3	+	1

žiska červenohnědé až tmavě červené barvy. Mízní uzliny mediastinální i bronchiální byly silně zduřelé, edematózní a překrvené. Ostatní orgány byly beze změn.

Tele č. 4, vykrvené *sub finem* čtyři dny po infekci, vykazovalo poněkud odlišný patologicko-anatomický nález. Plice a sliznice trachee a bronchů byly beze změn. V okolí epiglotis, na sliznici měkkého patra a tonsil byly ojedinělé drobné krváceniny a větší množství hleny s hnisavými vločkami. Sliznice nosní, v celém rozsahu hyperemická s drobnými krváceninami, pokrytá větším množstvím hlenohnisavého výpotku, se na některých místech snadno odlupovala. Drobné krváceniny byly nalezeny v duodenu, na přechodu duodena do jejunu, na ileocekální chlopni a na sliznici rekta. Mízní uzliny mezenterální byly silně zvětšené, na řezu šťavnaté. Ostatní orgány byly beze změn.

U kontrolního telete č. 6 byl patologicko-anatomický nález negativní.

HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Tele č. 3. Histologický nález na respiračním aparátě byl charakterizován edémem sliznice dutiny nosní, hrtanu a průdušnice, se značným množstvím hleny na povrchu epitelu a migrací neutrofilů s mononukleáry do epitelu.

V. Sérologická odpověď telat po experimentální infekci

Tele čís.	Titř VN protilátek		
	před infekcí	po infekci za dní	
1	negativní	21	32
2	negativní	6	negativní
3	negativní	17	2
4	negativní	3	negativní
5	negativní	21	16
6	negativní	7	negativní

Na sliznici dutiny nosní byly zjištěny fibrinózní pseudomembrány, pokrývající epitel, který byl silně infiltrován neutrofily.

Ojediněle byla pozorována i drobná nekrotická ložiska v epitelu sliznice nosní, epiglotis a horní části průdušnice. Tato nekrotická tkáň byla dobře oddělena od zdravé tkáně demarkační zónou. Na některých místech sliznice tracheální byla shledána zbuřelá ložiska se značnou deskvamací (obr. 8).

Změny v plicích poukazovaly na katarální bronchopneumonii, kde v zánětlivém exsudátu převažovaly neutrofily.

V mízních uzlinách střevních se vyskytovaly zánětlivé zóny, jeví se jako difúzní lymfoidní hyperplasie a hyperemie korových síní. Podobné změny jsme nacházeli i v tonsilách.

U telete č. 2. byly histologické změny méně intenzivní. Na sliznici horních cest dýchacích, hlavně sliznice nosní, epiglotis a průdušnice byla patrná hyperemie, mírná migrace neutrofilů a mononukleárů do epitelu a na některých místech deskvamace epitelu. Části plic měly změny, svědčící pro katarální bronchopneumonii. V zánětlivém exsudátu převažovaly mononukleáry. Změny v mízních uzlinách střevních a tonsilách byly stejné jako u telete č. 3.

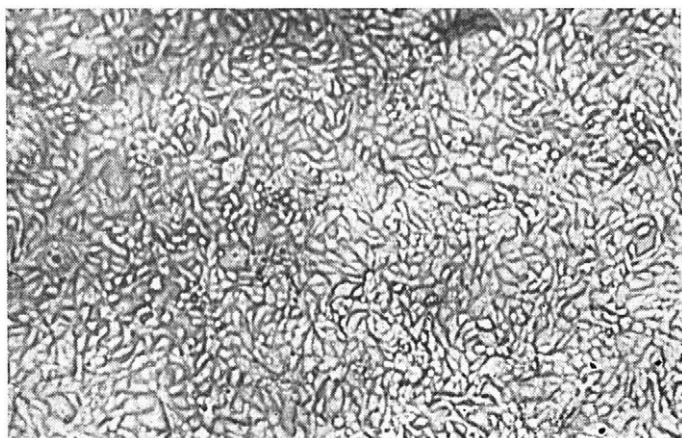
Virus IBR byl izolován z nosních a očních výtěrů, sliznice nosní a tracheální, tonsil, plic, mízních uzlin plicních, sleziny a krve experimentálně infikovaných telat (tab. IV).

U obou přeživších telat (č. 1 a 5), i u telete č. 3, poraženého za 17 dní po infekci, byl zaznamenán vzestup VN protilátek (tab. V).

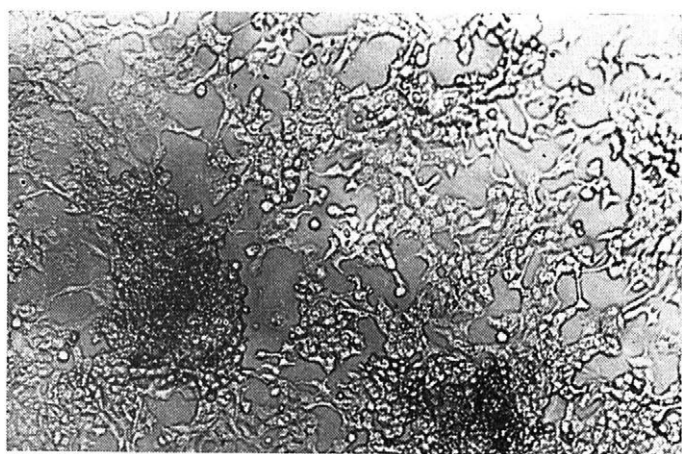
DISKUSE

V dřívějších pracích (Menšík a kol. 1967) jsme upozornili na přítomnost *Myxoviru parainfluenzae* 3 v chovech skotu v ČSSR a na jeho účast při vzniku respiračního syndromu u mladých telat ve velkokapacitních teletnicích. Těžký akutní průběh onemocnění telat, která jsou ve věku 7 až 14 dní transportována na různé vzdálenosti, připomínal přepravní chorobu (Reisinger a kol. 1959, Abinanti a kol. 1960).

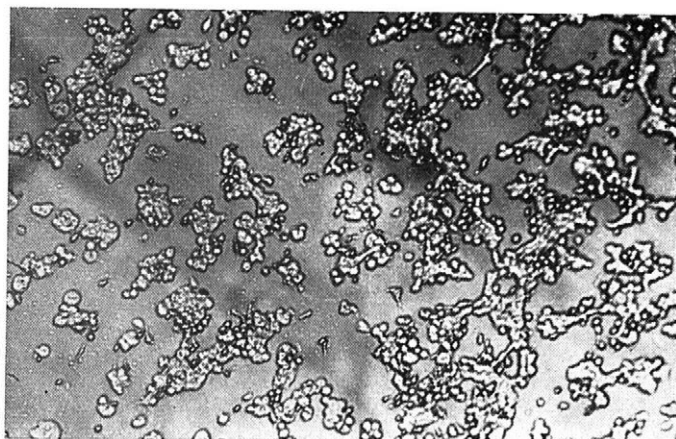
I za předpokladu, že průběh onemocnění po infekci virem PI-3 je nepříznivě ovlivňován vysokou koncentrací zvířat a řadou stressových faktorů, které



1. Tkáňová kultura telecích ledvin (linie TL-72) pět dní po nasazení (foto dr. Pleva)



2. Tkáňová kultura telecích ledvin (linie TL-72) infikovaná virem IBR, kmen M-13, 3. pasáž, 14 hodin po infekci (foto dr. Pleva)

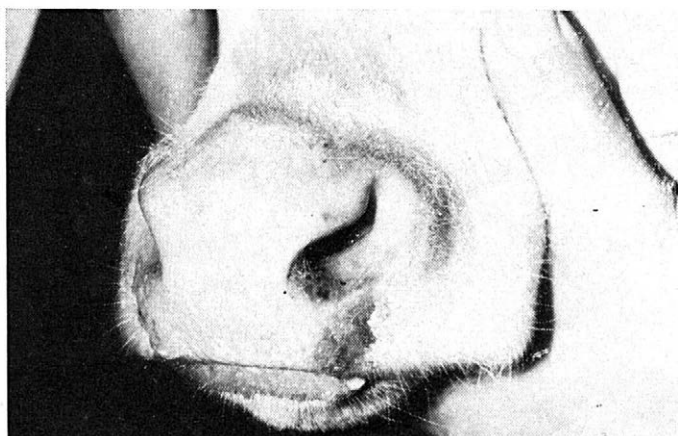


3. Tkáňová kultura telecích ledvin (linie TL-72) infikovaná virem IBR, kmen M-13, 3. pasáž, 24 hodiny po infekci (foto dr. Pleva)

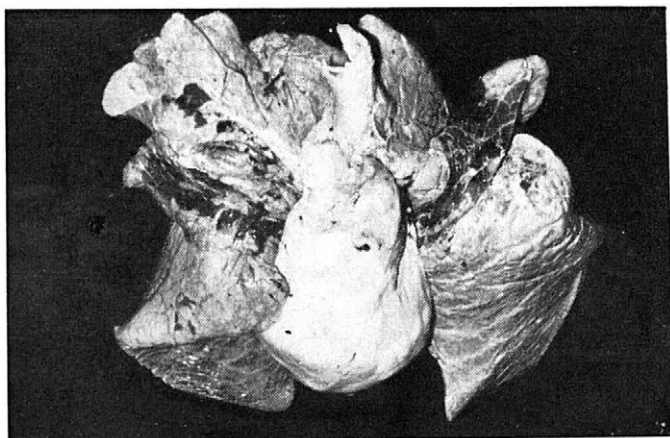
4. Tkáňová kultura primárních telecích varlat, infikovaná virem IBR, kmen R-6, 7. pasáž, barvena hem.-eosinem, za 12 hodin po infekci; vytváření charakteristických intranukleárních inkluzí (foto dr. Pleva)

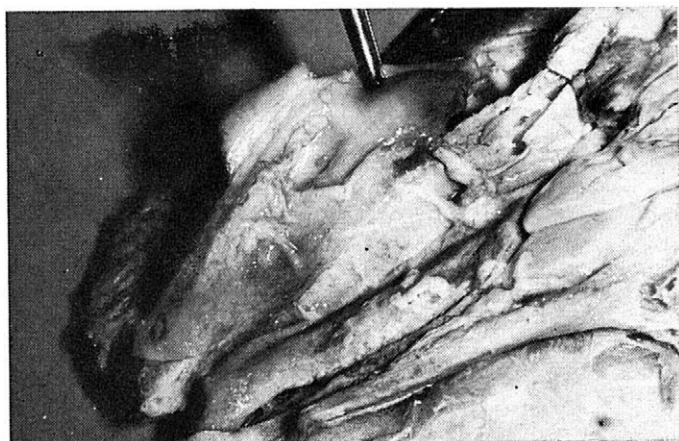


5. Hojný hlenovitý výtok z nosu u telete experimentálně infikovaného virem IBR, kmen R-6, za čtyři dny po intranazální infekci (foto Maršálek)

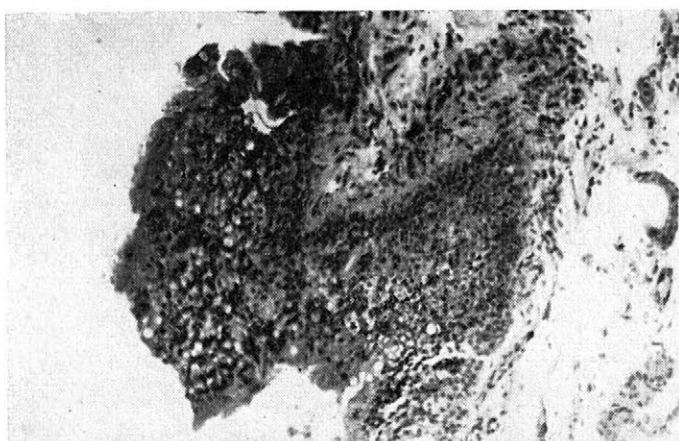


6. Pneumonické změny v apikálních lalocích plic u telete infikovaného virem IBR, kmen R-6, za šest dní po infekci (foto Maršálek)





7. Změny na sliznici nosní u telete experimentálně infikovaného virem IBR, kmen M-13, poraženého za 17 dní po infekci (foto Maršálek)



8. Změny na epitelu sliznice tracheální u experimentálně infikovaného telete virem IBR, kmen R-6, za 17 dní po infekci (foto dr. Rozkošný)



provázejí odchov telat v centrálních odchovných zařízeních (Reisinger a kol. 1959, Bögel 1961, Gale a King 1961), mohli jsme jen obtížně vysvětlit časté případy exacerbací a progresivního vývoje onemocnění jen na základě výsledků bakteriologického vyšetření. Bylo to především v těch případech, kdy těžký a protrahovaný průběh onemocnění měl za následek zpomalení vývoje a zakrsání telat nebo i nutné porážky. Jako příčinu těchto stavů, které byly charakterizovány chronickým průběhem a v histologickém obraze, připomínaly atypické pneumonie skupiny B (Jarret 1954) později klasifikované jako „cuffing pneumonie“ (Jarret 1956), jsme mohli shodně s jinými autory (Harbourne a kol. 1965, Dawson a kol. 1966, Leach 1967), označit zárodek *Mycoplasma bovirhinis* (Menšík a kol. 1968).

Hromadný výskyt těchto chronických pneumonií telat, které se nijak nelišily od případů popisovaných Dawsonem a kol. (1966), jsme zaznamenávali ve velkokapacitních odchovných zařízeních v letech 1965 až 1968 v různých ročních obdobích, s mírným poklesem v podzimních a letních měsících. V letním období roku 1968 jsme poprvé pozorovali ve velkokapacitním teletníku v Tr. vzplanutí akutního respiračního onemocnění s vysokými teplotami u telat tři až šest měsíců starých. Patologicko-anatomické změny byly lokalizovány jednak v plicích, jednak v horních cestách dýchacích. Obdobný syndrom se vyskytl na farmě P. ve výkrmě skotu u zvířat 2 až 12 měsíců starých. V obou případech byl vznik onemocnění náhlý a vysilující záchvatový kašel postihl během 24 hodin všechna ustájená zvířata. Akutní stadium choroby s teplotami 41 až 42 °C a s mírnými změnami na horních cestách dýchacích bylo krátké a rekonvalescence poměrně rychlá. Další případy hromadných onemocnění mladého skotu, které připomínaly IBR (McIntyre 1954), byly zaznamenány i v jiných lokalitách v zimním a jarním období 1969. I když na možnost výskytu této nákazy u nás upozornil Vrtiak a kol. již v roce 1965, nebyl dosud virus v chovech skotu prokázán. Izolace a identifikace viru IBR v ČSSR v souvislosti s akutním onemocněním mladého skotu doplňuje bohatou historii infekční boviní rhinotracheitidy v Evropě i v jiných zemích (Röhner 1967).

Kmen R-6 byl izolován ze spojivkového vaku telete, stíženého akutním respiračním onemocněním, kmen M-13 ze sliznice tracheální a nosní býka, který byl poražen v akutním horečnatém stadiu onemocnění. Podle dosavadních poznatků (York 1968) nemůžeme předpokládat dlouhodobou persistenci viru v plicní tkáni. Jeho průkaz v očním sekretu potvrzuje údaje McKerchera (1968) o jeho vylučování ze spojivkového vaku buď nosní cestou (kanálem nasokrimálním), nebo cestou očních výtoků.

Virus IBR se poměrně snadno pomnožuje v TK boviních embryonálních ledvinových buněk (York 1968) a dá se dobře pěstovat i na telecích, ovčích a kozích ledvinových buňkách (McKercher 1958/1959) i na jiných tkáních (York 1968).

V našich pokusech o izolaci viru jsme používali tkáňové kultury primárních telecích varlat a telecích ledvin, z nichž zejména tkáň telecích varlat se dobře osvědčila. Snadno jsme mohli oba kmeny adaptovat i na stabilní buněčné linii TL 72, kde se vytváří charakteristický CPE již za 24 až 48 hodin po infekci. Tato linie je vhodná pro sériové virusneutralizační testy.

Křížové virusneutralizační testy prokázaly, že oba naše izoláty jsou sérologicky shodné s prototypovým kmenem IBR-V-25. Oba izolované kmeny se ukázaly patogenní pro zdravá vnímavá telata a vyvolaly po intratracheální a intranazální infekci těžké akutní onemocnění s charakteristickými příznaky rhinitidy, tracheitidy, konjunktivitidy a bronchopneumonie, připomínající při-

rozené onemocnění v terénu, i popisy a údaje jiných autorů (R ö h r e r 1967). Opětné izolace viru z očních a nosních výtěrů, ze sliznice tracheální a nosní i z krve potvrzuje etiologii studované nákazy.

Vzestup titru protilátek u pokusných telat, i když není zvlášť výrazný, odpovídá nálezům zjištěným jinými autory a je považován za signifikantní. Také histologický nález u pokusných experimentálních telat odpovídá změnám popsaným Millerem (1955), s tím rozdílem, že jsme nemohli potvrdit přítomnost intranukleárních inkluzí v epitelu horních cest dýchacích pravděpodobně proto, že pokusná telata byla porážena za dobu delší než tři dny po infekci.

Literatura

- ABINANTI F. R., DYRNE R. J., WATSON R. L., POELMA L. J., 1960, Observation of infections of Cattle with *Myxovirus Parainfluenzae* 3. Am. J. Hyg., 71, 52-58.
- BARENFUS M., DELLI QUADRI C. A., MC INTYRE R. W., SCHROEDER R. J., 1963, Isolation of Infectious *Bovine Rhinotracheitis virus* from Calves with *Meningoencephalitis*. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 143 : 225-228.
- BÖGEL K., 1961, Virological Investigation Results in Calves with Respiratory Syndrome with Specific Regard to the Parainfluenza - 3 Virus Infection. Monatsh. Tierheilk., 13 : 162-174.
- DARBYSHIRE J. H., DAWSON P. S., PATERSON A. B., LOOSMORE R. M., 1962, The Isolation of Infectious *Bovine Rhinotracheitis Virus* in the United Kingdom: A Preliminary Report. Vet. Rec. 74 : 156-157.
- DAWSON P. S., DARBYSHIRE J. H., LOOSMORE R. M., PATERSON A. B., FAULL W. B., 1962, Infectious *Bovine Rhinotracheitis* (IBR). A Clinical Condition of Cattle Occurring in the United Kingdom. Vet. Rec. 76 : 1379-1383.
- DAWSON P. S., STUART P., DARBYSHIRE J. H., 1966, Respiratory Disease in a Group of Intensively Reared Calves. The Vet. Record, 78 : 543-546.
- DOMÁN I., FODOR P., 1961, Adatok a szarvasmarhák fertőző rhinotracheitiséhez (Experiences of Infectious Rhinotracheitis of Cattle). Magyar Állatorvosok lapja, 16 : 210-213.
- GALE C., KING N. B., 1961, Isolation of a Virus from Clinical Shipping Fever in Cattle. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 138 : 235-238.
- GILLESPIE J. H., LEE K. M., BAKER J. A., 1957, Infectious *Bovine Rhinotracheitis*. Amer. J. Vet. Res., 18 : 530-535.
- GILLESPIE J. H., MC ENTKE K., KENDRICK J. W., WAGNER C. W., 1959, Comparison of infectious pustular vulvovaginitis with infectious rhinotracheitis virus. Cornell Vet., 49 : 288.
- GRATZEK J. B., RAMSEY F. K., 1966, Isolation and characterization of a Strain of Infectious *Bovine Rhinotracheitis virus* Associated with *Enteritis* in Cattle: Isolation, serological Characterization, and Induction of the Experimental Disease. Am. J. Vet. Res., 27 : 1567-1572.
- GREIG A. S., 1961, The Detection of Antibody to Infectious *Bovine Rhinotracheitis Virus* in Ontario Cattle. Canad. J. comp. Med. Vet. Sci., 25 : 31-34.
- GRÜNDER H. D., REULEAUX I. R., LIESS B., 1960, Feststellung der virusbedingtem *Rhinotracheitis infectiosa* des Rindes (I. Herkunft und Isolierung des Virus). Dt. Tierärztl. Wschr., 67 : 514-519.
- HARBOURNE J. F., HUNTER D., LEACH R. H., 1965, The Isolation of *Mycoplasma* from Bovine Lungs and Nasal Swabs. Res. Vet. Sci., 6 : 178-188.
- HUGHES J. P., OLANDER H. J., WADA M., 1964, *Keratoconjunctivitis* Associated with Infectious *Bovine Rhinotracheitis*. J. Amer. vet. Med. Assoc., 145 : 32-39.
- CHENNEKATU P. P., GRATZEK J. B., RAMSEY F. K., 1966, Isolation and Characterisation of a Strain of Infectious *Bovine Rhinotracheitis Virus* Associated with *Enteritis* in Cattle: Pathogenesis Studies by Fluorescent Antibody Tracing. Am. J. Vet. Res., 27 : 1583-1590.
- CHAMBERLAND H., MAROIS P., FRANCO D. E., 1963, Rhinotrachéite infectieuse bovine chez les vaches laitières au Québec. Canad. J. comp. Med. Vet. Sci., 27 : 181-185.
- CHOW I. L., 1961, Infectious *Bovine Rhinotracheitis* in Range Cattle of Colorado. J. Amer. vet. Med. Assoc., 138 : 50-60.

- INTYRE MAC R. W., 1954, Experimental Studies of Acute Upper Respiratory Infection in Calves. J. Amer. vet. Med. Assoc., 125 : 473-474.
- JARRETT W. F. H., 1954, Atypical Pneumonia in Calves. J. Path. Bact., 67 : 441-454.
- JARRETT W. F. H., 1956, The Pathology of Same types of Pneumonia and Associated Pulmonary Diseases of the Calf. Br. vet. J., 112 : 431-452.
- JOHNSTON L. A. Y., SIMMONS G. C., GAUIN M. D., 1962, A Viral Meningo-Encephalitis in Calves. Austral. Vet. J., 38 : 207-215.
- KENDRICK J. W., GILLESPIE J. M., MC ENTEE K., 1958, Infectious Pustular Vulvovaginitis of Cattle. Cornell vet., 48 : 458-495.
- MC KERCHER D. G., MOULTON J. E., MADIN S. H., KENDRICK J. W., 1957, Infectious Bovine rhinotracheitis — A Newly Recognized Virus Disease of Cattle. Amer. J. Vet. Res., 18 : 246-256.
- MC KERCHER D. G., WADA E. M., 1964, The Virus of Infectious Bovine Rhinotracheitis as a Cause of Abortion in Cattle. J. Amer. vet. Med. Assoc., 144 : 136-142.
- MC KERCHER D. G., 1968, Bovine Respiratory Infections. J. Amer. vet. Med. Assoc., 152 : 729-733.
- LEACH R. H., 1967, Comparative Studies of *Mycoplasma* of bovine Origin. 2nd Conference of Biol. on Mycopl. 1966. Annals N. Y. Acad. Sci., 143 : 305.
- LIESS B., KNOCKE K. W., SCHIMMELPFENNIG H., 1960, Feststellung der virusbedingten Rhinotracheitis infectiosa des Rindes. II. Kulturelle, serologische und elektronoptische Charakterisierung des Virus unter Berücksichtigung der in Gewebekulturen auftretenden cytopathischen Veränderungen. Dt. Tierärztl. Wschr., 67 : 551-558.
- MADIN S. H., YORK C. J., MC KERCHER D. G., 1956, Isolation of the Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. Sci., 124 : 721-722.
- MENŠÍK J. a kol., 1967, Izolace a identifikace virových agens zúčastněných na respiračních infekcích skotu v ČSSR. Záv. zpráva, VÚVL Brno.
- MENŠÍK J. a kol., 1968, Etiologie, epizootologie a diagnostika chronických pneumonií telat a mladého skotu ve VKT. Záv. zpráva VÚVL, Brno.
- MILLER N. J., 1955, Infectious Necrotic Rhinotracheitis of Cattle. J. Amer. vet. Med. Assoc., 126 : 463-467.
- MORETTI B., ORFEI Z., MONDINO G., PERSECHINO A., 1964, La rinotracheite infettiva del bovino (IBR): osservazioni cliniche ed isolamento del virus. Vet. Italiana, 15 : 677-690.
- PLUMER G. J., 1960, Conjunctivitis and IBR in Maryland. Med. Vet., 9 : 9.
- REISINGER R. C., HEDDLESTON K. L., MANTHEI C. A., 1959, A Myxovirus (SF 4) Associated with Shipping Fever of Cattle. J. Amer. vet. Med. Assoc., 135 : 147-152.
- RÖHRER H., 1967, Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren. VEB G. Fischer Verlag, Jena.
- SATTAR S. A., BOHL E. H., TRAPP A. L., 1967, Abortion in Cattle Caused by Experimental Infection with Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. Cornell. Vet., LVII : 438-453.
- SCHROEDER R. J., MOYS M. D., 1954, An acute upper respiratory infection of dairy cattle. J. Amer. vet. Med. Assoc., 125 : 471.
- VRTIAK O. J. a kol., 1965, Nákazlivé choroby hospodárskych zvierat. 2. Virusové a rickettsiové choroby. SVPL Bratislava.
- WEBSTER R. G., MANKTELOW B. W., 1959, Some Observations on Infectious Bovine rhinotracheitis in New Zealand. New Zealand Vet. J., 7 : 143-148.
- YORK CH. J., 1968, Infectious bovine Rhinotracheitis. J. Amer. vet. Med. Assoc., 152 : 758-762.
- YORK CH. I., SCHWARZ J. F., ESTOLA L. A., 1957, Isolation and Identification of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus in Tissue Culture. Vet. Med. 53 : 522-524.
- YAMADA S., KODA Y., ICHIHARA T., 1964, Distribution of neutralizing antibody for Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) Virus in southern Japan. J. Jap. vet. Med. Assoc., 17 : 28-30.

Došlo dne 29. 7. 1969

МЕНШИК Й., РОЗКОШНЫ В. (НИИ ветеринарии, Брно, Чехословакия). Доказательство вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в связи с острым заболеванием дыхательных путей телят и молодняка крупного рогатого скота. Вет. Мед. (Прага) 14 (12) : 653-664, 1969.

Из случаев острой вспышки заболевания дыхательных путей телят, отличающегося внезапным возникновением, высокой температурой и 100%-й заболеваемостью в пораженном телятнике, на первичных тканевых культурах телячьих почек и телячьих семенников изолировали два штамма вируса инфекционного ринотрахеита (R 6 и M 13). Было установлено, что оба штамма серологически аналогичны с образцами штамма V-25; оба они патогенны для телят и после экспериментальной, интраназальной и интратрахеальной инфекции вызвали у них заболевание, схожее с заболеванием на местах. Значительный рост вирусонейтрализующих антител и изоляция вируса из дыхательного аппарата подопытных телят спустя 3—17 дней после заражения подтверждают значение вируса инфекционного ринотрахеита в этиологии дыхательных инфекций крупного рогатого скота в ЧССР.

инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота; изоляция и идентификация вируса; ход заболевания; экспериментальный перенос

MENŠÍK J., ROZKOŠNÝ V. (Research Institute of Veterinary Medicine, Brno, Czechoslovakia). *The Proving of the IBR Virus in Connection with an Acute Respiratory Disturbance of Calves and Young Cattle*. Vet. Med. (Praha) 14 (12): 653-664, 1969.

In cases of an acute break out of a respiratory disturbance of calves characterized by a sudden appearance, by high temperatures, and by a 100 per cent morbidity of the calves of the attacked rearing installation, two strains of the infectious bovine rhinotracheitis - IBR - virus (R 6 and M 13) were isolated in primary tissue cultures of the livers and testes of the calves. Both mentioned strains were identified as strains serologically identical with the reference strain IBR-V-25. Both proved pathogenic for calves, in which, after experimental intranasal and intratracheal infection, they produced symptoms that were identical with the disease in the field. The significant increase of the virus-neutralizing antibodies and the isolation of the virus from the respiratory tract of the experimental calves in 3—17 days after the infection confirm the importance of the IBR virus in the etiology of respiratory infections of cattle in Czechoslovakia.

infectious bovine rhinotracheitis; isolation and identification of a virus; the course of the disturbance; experimental transmission

MENŠÍK J., ROZKOŠNÝ V. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Nachweis des IBR-Virus im Zusammenhang mit einer akuten respiratorischen Erkrankung von Kälbern und Jungvieh*. Vet. Med. (Praha) 14 (12): 653-664, 1969.

In Fällen von akuten respiratorischen Erkrankungen der Kälber, charakterisiert durch plötzliches Ausbrechen der Krankheit, hohe Temperaturen und 100 %ige Morbidität, wurden bei den Kälbern im verseuchten Aufzuchtstall an den primären Kalbsnieren- und Kalbshoden-Gewebekulturen zwei infektiöse bovine Rhinotracheitis - IBR - Virusstämme (R 6 und M 13) isoliert. Beide angeführten Stämme wurden als serologisch identisch mit dem Referenzstamm IBR-V-25 identifiziert. Beide Stämme erwiesen sich als pathogen für Kälber, bei welchen sie nach experimenteller, intranasaler und intratrachealer Infektion eine mit den Erkrankungen im Terrain identische Erkrankung hervorriefen. Die signifikante Zunahme der Virusneutralisations-Antikörpermengen und die Isolierung des Virus aus dem Respirationstrakt der Versuchskälber innerhalb von 3 bis 17 Tagen nach der Infektion bestätigen die Bedeutung des IBR-Virus für die Ätiologie von respiratorischen Infektionen beim Rind in der ČSSR.

Infektiöse bovine Rhinotracheitis; Isolierung und Identifizierung des Virus; Verlauf der Krankheit; experimentelle Übertragung

Adresa autorů:

Doc. MVDr. J. Menšík, CSc., MVDr. V. Rozkošný, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno - Medlánky

IZOLACE CYTOPATOGENNÍCH KMENŮ PŮVODCE VIROVÉ GASTROENTERITIDY PRASAT VE TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH

J. Štěpánek, E. Mesároš, Z. Pospíšil

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

ŠTĚPÁNEK J., MESÁROŠ E., POSPÍŠIL Z. *Izolace cytopatogenních kmenů původce virové gastroenteritidy prasat ve tkáňových kulturách.* Vet. Med. (Praha) 14 (12) : 665-674, 1969.

Z tenkých střev a trusu zjevně klinicky nemocných selat do stáří deseti dnů z pěti lokalit výskytu virové gastroenteritidy prasat (VGP) byly izolovány virové kmeny. Pomnožovaly se ve tkáňových kulturách z primárních prasečích ledvin s tvorbou cytopatických změn, které se objevily v šesté až osmé pasáži. Inkubační perioda, nutná pro jejich vytvoření, kolísala podle množství viru v inokulu. V prvních dnech po infekci byl cytopatický efekt charakterizován vytvářením shluků zakulacených degenerovaných buněk na povrchu monolayeru. Výraznější cytopatické změny se objevily třetí až pátý den po infekci. Ve tkáňových kulturách z primárních prasečích ledvin dosahovaly viry titr 10^5 až 10^6 TKID₅₀. Cytologickým vyšetřením infikovaných tkáňových kultur byly nejmarkantnější změny zjišťovány na jádrech. Docházelo ke kondenzaci a později k rozpadu jaderného chromatinu. Chromatinová granula se lokalizovala ve formě prstence v blízkosti jaderné membrány. Syncytia, ani intranukleární nebo intracytoplasmatické inkluze nebyly pozorovány.

virová gastroenteritida prasat; izolace viru; tkáňové kultury; cytopatický efekt; titrace viru; cytologické změny

Virová gastroenteritida (Transmissible gastroenteritis of Pigs-TGE) je vysoce infekční onemocnění prasat způsobené virem, které se klinicky manifestuje průjmem, zvracením, dehydratací a vysokou mortalitou novorozených selat. Jako samostatné onemocnění v komplexu gastroenterálních poruch prasat byla popsána ve Spojených státech Doylem a Hutchingsem (1946). Zdárné pokusy o přenos infekce na vnímavá selata bezbakteriálními suspenzemi ze zvířat uhynulých na VGP byly prvním ukazatelem, že původcem nemoci je virus. Definitivně byla však virová etiologie této nákazy prokázána až izolací původce ve tkáňových kulturách.

V prvních pracích, které referují o zdárné propagaci viru VGP v jednovrstevných kulturách prasečích ledvin (Aldásy a kol. 1966, Eto a kol. 1962, Ichi-hara a kol. 1964, Lee 1956, Pehl a Berndorf 1960), sleziny (Eto a kol. 1962), psích ledvin (Welter 1965) a v amniotickém vaku kuřecích embryí (Eto a kol. 1962, Lee 1956) nejsou popisovány žádné cytomorfologické změny infikovaných buněk. Cytopatogenní kmeny viru VGP byly izolovány teprve později ve tkáňových kulturách prasečích ledvin (Cartwrightová a kol. 1965, Cartwrightová 1966, Ditchfield a kol. 1967, Fejtěngejmer a Jamašev 1966, Harada a kol. 1963, 1967, Mc Clurkin 1965, Mc Clurkin a Norman 1966, Nikol'skij a Krasnobajev 1966, Witte a Esterday 1967), varlat (Noble 1964) a slinných a tyreoidních žláz (Witte a Easterday 1967). Mc Clurkin a Norman (1966, 1967) se domnívají, že v etiologii VGP se uplatňují dva viry: virus cytopatogenní

a virus, který se ve tkáňových kulturách sice pomnožuje, ale nevyvolává cytopatické změny. Oba tyto viry se vyskytují buď samostatně nebo společně ve směsné kultuře.

Tato práce popisuje izolaci a propagaci cytopatogenních kmenů viru VGP ve tkáňových kulturách prasečích ledvin a charakter jimi vytvářených cytopatických změn.

MATERIÁL A METODIKA

1. ODBĚR MATERIÁLU K IZOLAČNÍM POKUSŮM

a) Odběr a skladování vzorků: Materiál k izolaci viru jsme získávali v chovech, kde byla virová gastroenteritida diagnostikována podle klinických a epizootologických příznaků, biologickým pokusem na selatech, nebo fluorescenčním vyšetřením. Orgány, tenká a tlustá střeva a mezenteriální mízní uzliny jsme odebírali pouze od selat do 10 dnů stáří, zjevně klinicky nemocných, nikoliv od kusů v premortálním stadiu nebo uhynulých. Vzorky trusu jsme odebírali rektální lžičkou. Ihned po odběru byly vzorky zmrazeny a skladovány až do použití při -60°C .

b) Zpracování vzorků: Vzorky orgánů nebo trusu byly rozmrazeny při teplotě 4°C , smíseny s Earlovým roztokem (pH 7,2) v poměru 1 : 10 a homogenizovány v chlazeném mixeru po dobu pěti minut. První desetimínutovou centrifugací při 1000 až 1500 ot./min. byly odstraněny hrubé komponenty. Následné jednodinové odstředění v chlazené centrifuze při 4°C a při 15 000 ot./min. omezovalo na minimum bakteriální kontaminaci. Po přidání antibiotik (1000 mj. penicilinu a 2,0 mg streptomycinu na 1 ml) byl získaný supernatant ponechán 24 hodin v lednici, testován na bakteriální sterilitu, rozplněn po 5 ml do ampulí a uložen při -60°C .

2. TKÁŇOVÉ KULTURY

a) Příprava tkáňových kultur: Tkáňové kultury z prasečích ledvin jsme připravovali ze selat do čtyř týdnů stáří podle původní metody Dulbecco a Voigt (1954).

K trypsinaci jsme však používali směsi trypsinu a versenu ve složení:

600 ml PBS (pufovaný fyz. roztok bez iontů kalcia a magnezia)

400 ml 0,4% trypsinu (naředěn v PBS)

1000 ml 0,02% versenu (naředěn v PBS)

5 ml 7% NaHCO_3

Po opakované 30 a 15minutové pretrypsinaci a promytí v PBS byly ledvinové fragmenty trypsinovány v desetimínutových a později ve tří až pětiminutových intervalech. Tkáňové kultury jsme zakládali z buněčných suspenzí o hustotě 800 000 až 1 000 000 neporušených buněk v 1 ml Hanksova roztoku s 20 % inaktivovaného telecího séra, 0,5 % laktalbuminhydrolyzátu (LAH) a 0,1 % kvasnicového extraktu.

b) Infekce tkáňových kultur: Inokulační dávka na jednu zkumavku s kompletně narostlým monolayerem byla při aplikaci původní suspenze i při dalších pasážích 0,1 ml. Po jedno až dvouhodinové adsorbci inokula na holém buněčném porostu v termostatu (při 37°C) jsme do zkumavek přidali udržovací medium v dávce 1 ml (Earlův solný roztok, obohacený 2 % telecího séra, 0,5 % LAHu a 0,1 % kvasnicového extraktu). Zkumavky inokulované původní orgánovou suspenzí byly před přidáním media vypláchnuty PBS, aby se snížil cytotoxický účinek orgánových suspenzí.

Infikované tkáňové kultury byly denně mikroskopicky vyšetřovány. Bez ohledu na to, zda se cytopatický efekt vytvořil či ne, byla jedna zkumavka čtvrtý den po infekci uložena při -60°C . V dalších zkumavkách bylo vyměněno udržovací medium a byly dále sledovány do osmého dne. Vzorek získaný smísením medií, slitých čtvrtý a osmý den po infekci, byl použit k další pasáži.

c) Stanovení titru izolovaných nebo referenčních kmenů na tkáňových kulturách: Každým ředěním viru od 10^1 do 10^6 byly infikovány nejméně tři zkumavky s kompletně narostlými tkáňovými kulturami. Titr příslušného viru byl stanoven po rozvinutí cytopatických změn, tj. pátý až šestý den po infekci výpočtem podle Reeda a Muencha (1938) a vyjádřen jako logaritmus 10 TKID_{50} v 1 ml neředěné suspenze viru.

d) Příprava a barvení tkáňových kultur pro cytologické vyšetření: K cytologickému vyšetření jsme používali tkáňových kultur narostlých na sklíčkách vložených do zkumavek. Po slití media byly tkáňové kultury infikovány 0,2 ml virové suspenze. Udržovací medium bylo přidáno po jednodinové adsorpci. Za tři až čtyři hodiny po infekci byla sklíčka ze zkumavek odebrána, opláchnuta v PBS, fixována v Bouinově tekutině 10 až 15 minut a barvena hematoxilinem a eosinem.

3. VIROVÉ KMENY

a) Kmen 185 (Purdue) byl získán ze sbírky zoopatogenních mikroorganismů VÚVL Brno pod označením CAPM:V-91 (původ kmene — A. W. McClurkin, National Animal Disease Laboratory, Ames, Iowa, USA).

b) Kmen Sh (Shizuoka) byl získán ze sbírky zoopatogenních mikroorganismů VÚVL Brno pod označením CAPM:V-66 (původ kmene — K. Harada, National Institut Animal Health, Tokyo, Japan).

VÝSLEDKY

1. NÁKAZOVÁ SITUACE VE SLEDOVANÝCH CHOVECH

Chov č. 1 (ČSSS K.) První příznaky průjemitého onemocnění se vyskytly u odstavených selat v červenci 1966. Nemoc se potom rychle rozšířila v celém chovu a postihla i prasnice před porodem a po něm. Novorozená selata, která onemocněla krátce po porodu, uhynula všechna. Vysoká mortalita byla zaznamenána i u selat do 10 až 14 dnů stáří. U dospělých prasat k úhynu vůbec nedocházelo. Během tří dnů epizootie odezněla a v dalších porodních cyklech se již neobjevila. K izolacím byla odebrána tenká střeva, ze kterých byl izolován virus, označený M-15.

Chov č. 2 (ČSSS T., farma H) V tomto chovu se onemocnění objevilo na podzim 1966. První postiženou věkovou kategorií prasat byla selata ve stáří tři až deset dnů. Z celkového počtu 480 třídenních až šestitýdenních selat onemocnělo 85,3 % a uhynulo 41,5 %. Mezi novorozenými selaty byla mortalita 100 %. Ze 127 odstávců onemocnělo 23,5 % a uhynulo 30,7 %. Ojedinele se onemocnění objevilo i u prasat. První vlna nákazy odezněla za čtyři týdny. Virus byl izolován z tenkých střev selat a označen M-27.

Onemocnění vzplanulo znovu asi za měsíc. Objevilo se v předvýkrmně u nově zakoupených prasat za osm dní od doby, kdy byla přivezena do chovu. Postihlo všechna ustájená zvířata a trvalo 10 týdnů. Nákaza se pak v chovu udržovala v průběhu celého roku 1967. Manifestovala se zvýšeným úhynem selat do 10 dnů stáří v nepravidelných intervalech 30 až 60denních.

Chov č. 3 (ČSSS T., farma V) Zde probíhalo onemocnění podobně jako v chovu č. 2, odkud bylo pravděpodobně zavlečeno (jedná se o dvě farmy jednoho komplexu, vzdáleného asi 30 km). Při prvním vzplanutí postihlo onemocnění prasata všech věkových kategorií a udržovalo se v chovu téměř 10 až 12 týdnů, i když období kulminace nákazy trvalo asi tři až čtyři týdny. Onemocnění v chovu nevymizelo a projevovalo se občasnými úhyny selat v některých vrzích. Rozsáhlejší vlna úhynů se objevila poprvé za 22 dní a potom za dalších 8 týdnů. Virus byl izolován z trusu nemocných selat při druhém vzplanutí nákazy a označen M-42.

Chov č. 4 (JZD L.) V tomto plemenném chovu s průměrným počtem 30 prasnic, ustájených v boudách, se nákaza objevila v únoru 1967. První příznaky onemocnění byly zjištěny u prasnic v porodně, u 6 až 7týdenních selat a u odstávčat. Onemocnění se pak rozšířilo v celém chovu. Za 14 dní po jeho vzplanutí, kdy již nebyly ve stáji pozorovány klinické příznaky, se oprasilo 6 prasnic. Všech 70 novorozených selat onemocnělo a v průběhu 14 dnů uhynulo celkem 56 kusů. Virus byl izolován z tenkých střev a označen M-29.

Chov č. 5 (ČSSS H., farma B) Onemocnění propuklo v produkční stanici mezi tří až pětidenními selaty na konci února 1967. Postupně se rozšířilo i na selata starší. U prasnic byly příznaky onemocnění pozorovány pouze ojediněle. Z 505 selat uhynulo 479 kusů. Během jednoho měsíce nákaza z chovu vymizela a objevila se opět koncem května a v druhé polovině června. Virus byl izolován z trusu a označen M-38.

2. KLINICKÁ CHARAKTERISTIKA NÁKAZY

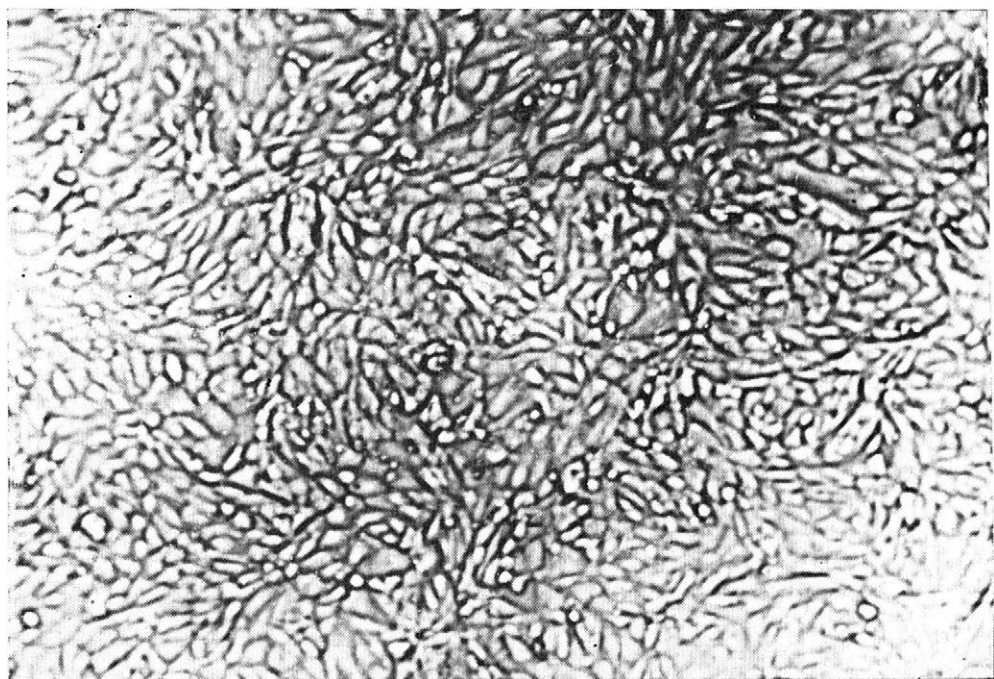
Pravidelným klinickým symptomem, který charakterizoval průběh nákazy u prasat všech věkových kategorií, byl profúzní, vodnatý průjem. U starších prasat a prasnic byla zjišťována i inapetence. Zvracení signalizovalo počátek onemocnění u novorozených selat a často se objevovalo ještě před rozvojem průjmu. Příznakem, který značně komplikoval průběh onemocnění u selat sajících, byla agalaxie kojících prasnic.

Selata hynula za tři až pět dní po prvním klinickém projevu. Byla značně dehydratovaná až kachektická. Onemocnění starších prasat trvalo maximálně jeden týden, nejčastěji jeden až dva dny.

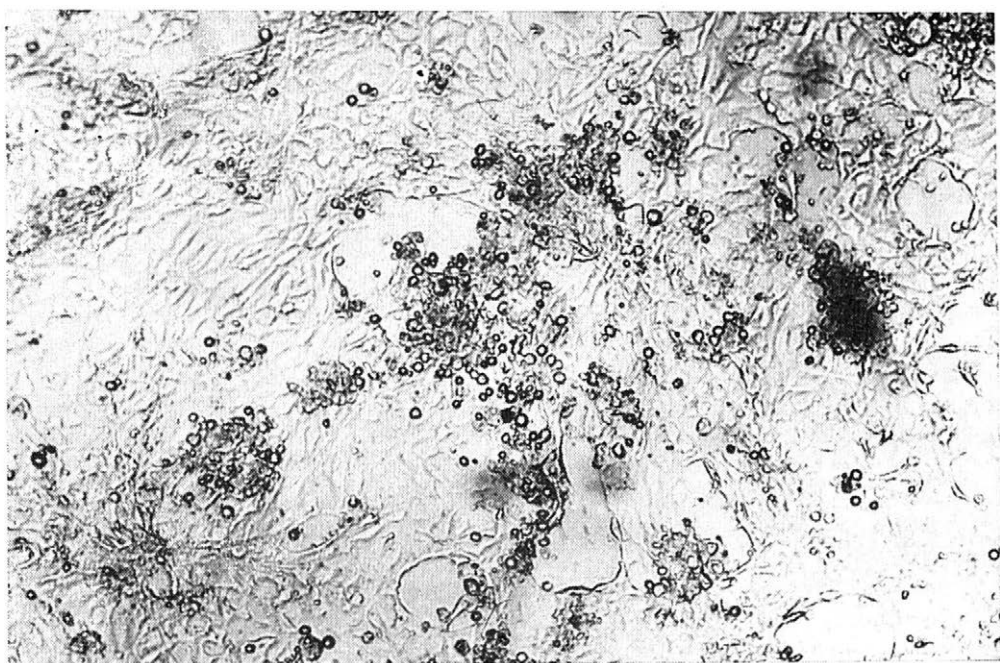
3. IZOLACE PŮVODCE VGP VE TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH A CHARAKTER CYTOPATICKÉHO EFEKTU

Agens izolovaná z výše uvedených pěti chovů vyvolávala na tkáňových kulturách z primárních prasečích ledvin cytopatické změny shodné s efektem typových kmenů (Purdue a Shizuoka). K jejich izolaci a adaptaci bylo nezbytné udělat 6 až 10 následných, sériových pasáží. Degenerativní změny, pozorované v první a eventuálně ve druhé pasáži, byly pravděpodobně způsobeny toxicitou orgánových suspenzí, protože v další kultivaci ve třech až pěti následujících pasážích zůstával monolayer až do 8. dne po infekci zcela beze změn.

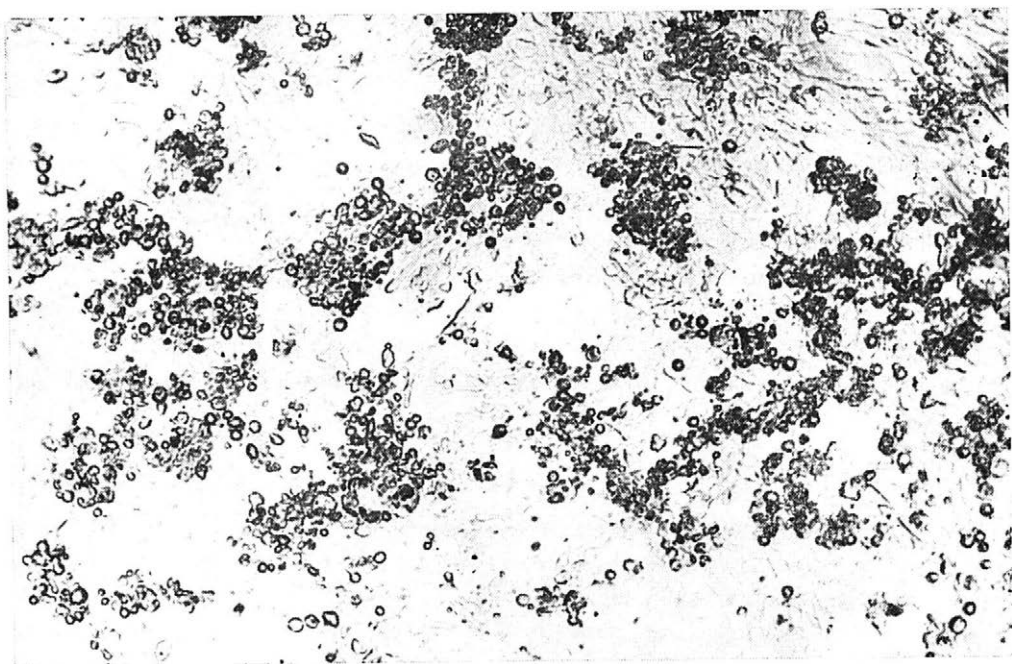
První příznaky cytopatického efektu byly pozorovány až v 6. (M-27), 7. (M-15, M-29, M-42) nebo v 8. (M-38) pasáži. Čtvrtý až šestý den po infekci se na povrchu neporušeného monolayeru začaly objevovat zakulacené, degenerované buňky, z počátku ojediněle, později v drobných shlucích. Další rozvoj cytopatického efektu nebyl v této pasáži zaznamenán a i v průběhu delší kultivace zůstával omezen pouze na nevýrazné, degenerativní změny. Teprve v dalších pasážích se cytopatické změny stávaly zřetelnějšími, nastupovaly rychleji a jejich rozsah se zvětšoval (tab. I, obr. 1–4).



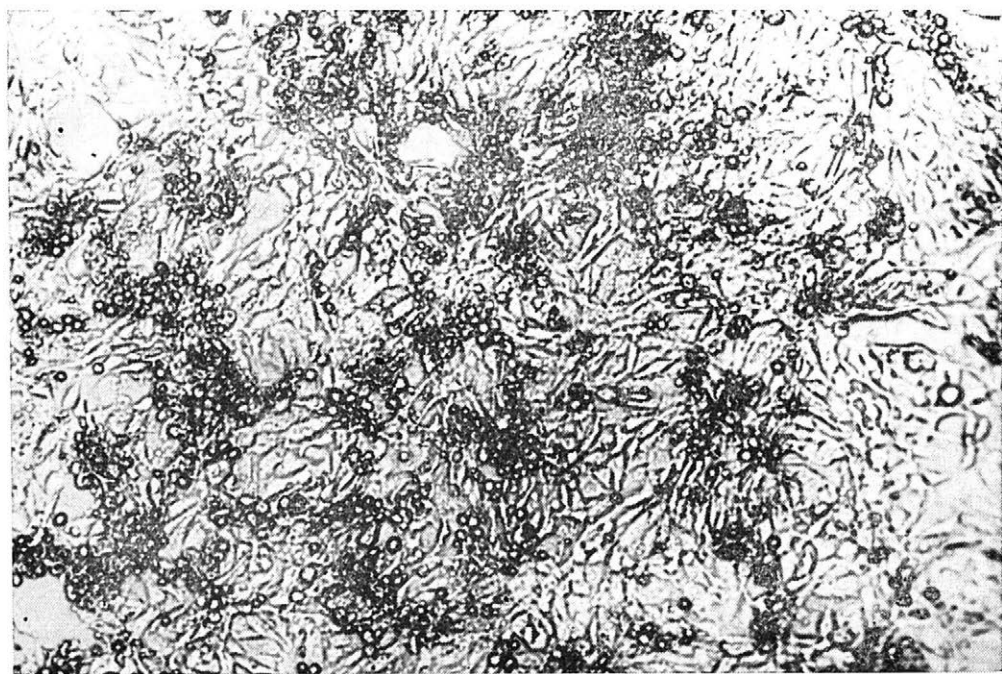
1. Tkáňová kultura z primárních prasečích ledvin, osmý den po nasazení



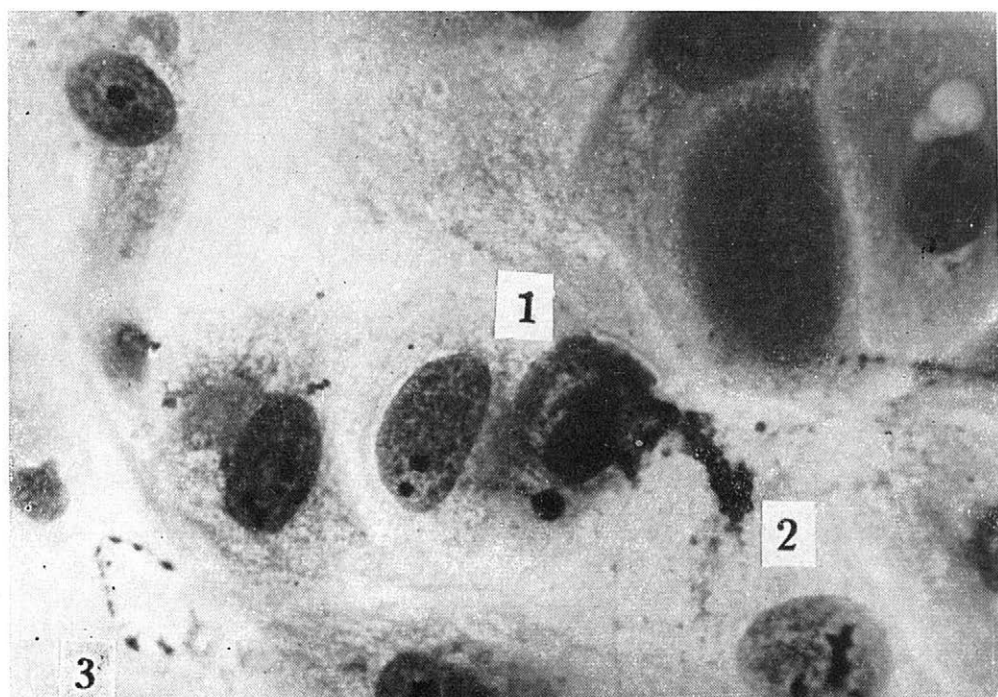
2. Tkáňová kultura z primárních prasečích ledvin, pátý den po nasazení, druhý den po infekci kmenem M-42/16. pasáž



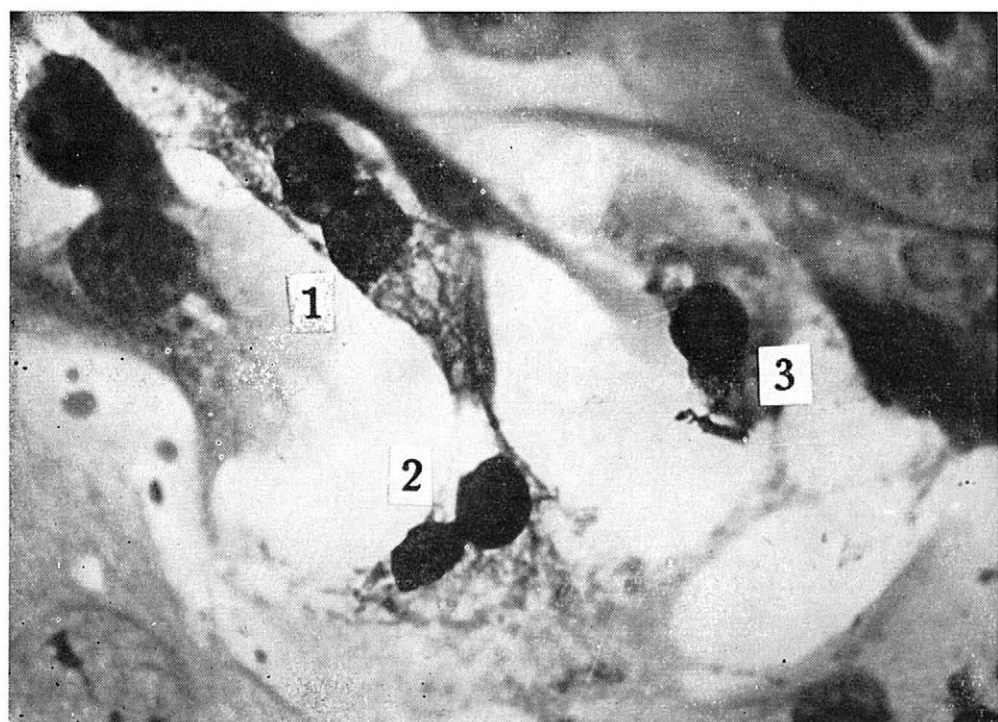
3. Tkáňová kultura z primárních prasečích ledvin, pátý den po nasazení, druhý den po infekci kmenem M-27/15. pasáž



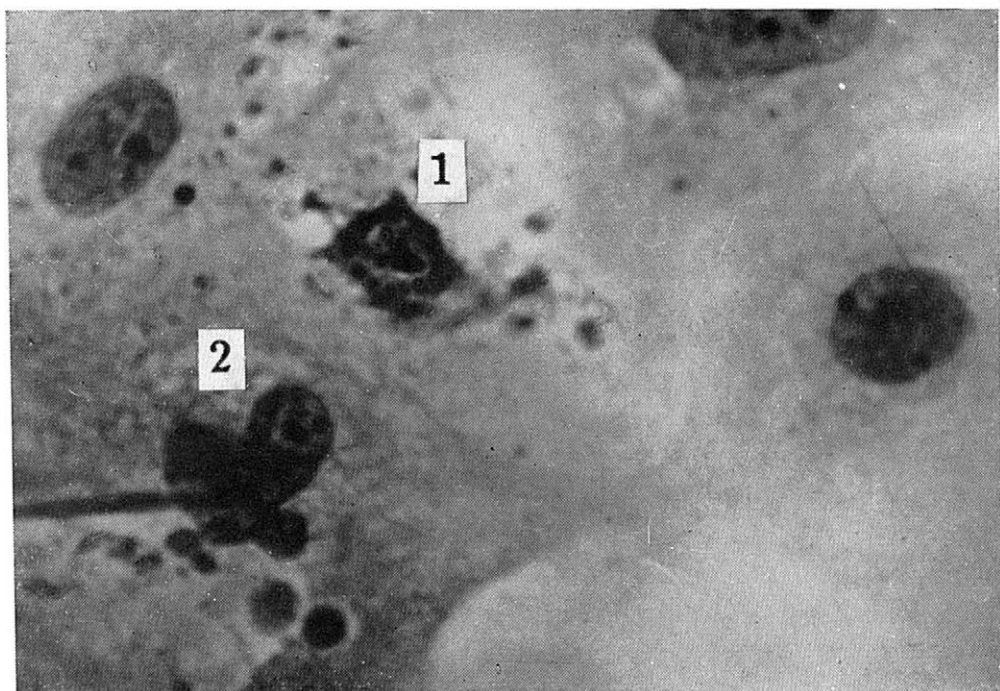
4. Tkáňová kultura z primárních prasečích ledvin, pátý den po nasazení, druhý den po infekci kmenem CAPM:V-91/26. pasáž
Fotografie 1—4. tkáňová kultura nativní, zvětš. neg. 20 : 1, foto MVDr. V. Pleva, CSc.



6. Ztemnělá cytoplazma a svažující se jádro v infikované buňce (1), hrudkovité zbytky jádra se mísí s cytoplazmatickým detritem (2), chromatinová granula nasedající na jadernou blánu (3)



7. Svažtělá jádra ve stahujících se dvoujaderných buňkách (1, 2), pyknotické jádro (3)



8. Typické uspořádání chromatinových granul na obvodu rozrušeného jádra (1), laločnaté jádro (2)



9. Postupující rozpad buněk poškozuje souvislost monolayeru a zbytky pyknotických jader se mísí s cytoplazmatickými masami

Fotografie 6—9, barveno hem. eos., zvětš. neg. 130 : 1, foto MVDr. V. Pleva, CSc.

Počet pasáží	Označení izolátů									
	M 15		M 27		M 29		M 38		M 42	
	dny po infekci	CPE	dny po infekci	CPE	dny po infekci	CPE	dny po infekci	CPE	dny po infekci	CPE
1. pasáž	3–8	×	2–3	×	2	×	3–4	×	2–3	×
2. pasáž	8	—	4	×	3–4	×	8	—	4	×
3. pasáž	8	—	8	—	8	—	8	—	8	—
4. pasáž	8	—	8	—	8	—	8	—	8	—
5. pasáž	8	—	8	—	8	—	8	—	8	—
6. pasáž	8	—	4	+	8	—	8	—	8	—
7. pasáž	5	+	2–3 4–5	++ +++	6	+	8	—	4–6	+
8. pasáž	4–6 6	++ +++	2 5	++ +++	3 6	++	6–8	+	2 4	++ +++
9. pasáž	2 5	++ ++++	5	++++	5	+++	4–5 6	++ +++	4 6–7	+++ ++++
10. pasáž	4–5	++++	5	++++	5 7	+++ ++++	2 4–5	++ ++++	4–5	++++
11. pasáž	4–5	++++	5	++++	4–6	++++	4–5	++++	4–5	++++

× = nespecifická degenerace

— = bez cytopatických změn

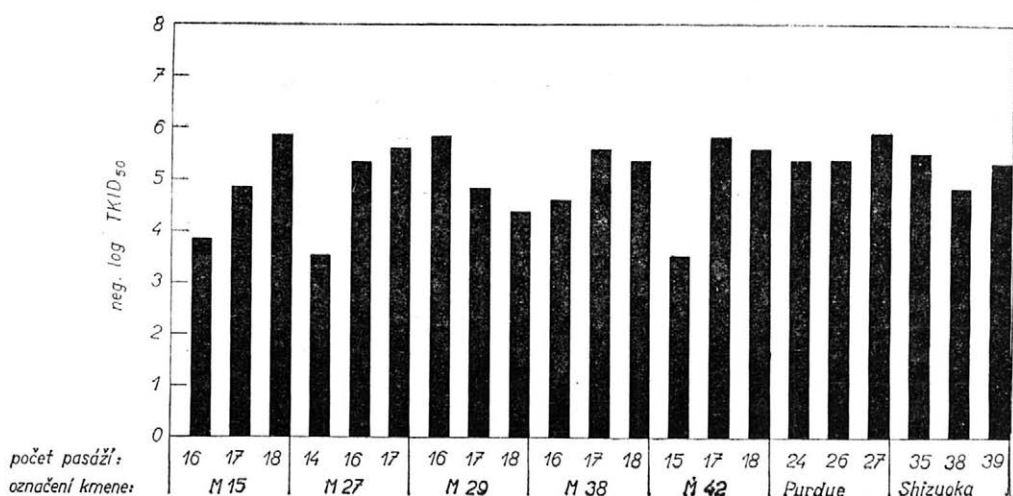
+ = počínající degenerativní změny, zakulacené degenerované buňky na povrchu monolayeru

++ = hrozníkovité shluky degenerovaných buněk na povrchu neporušené buněčné vrstvy

+++ = ojedinelá, postupně splývající oka v monolayeru

++++ = splývající destrukce postihující 50 až 80 % monolayeru

Degenerované buňky, které se na povrchu monolayeru utvářely již druhý až třetí den po infekci, se postupně formovaly do hrozníkovitých shluků, pokrývajících převážnou část jinak neporušené buněčné vrstvy. K prvním destrukčním změnám v monolayeru a k odpadávání buněk od povrchu skla docházelo pátý až šestý den po infekci. V dalších pasážích, kdy se cytopatický efekt postupně stabilizoval, se však podobné změny objevovaly za tři až čtyři dny po inokulaci. V monolayeru se objevovala drobná oka, obklopená shluky degenerovaných, zakulacených buněk, která postupně splývala dohromady, takže v šestém dnu po infekci byl porost rozrušen z 50 až 80 %. Na skle zůstávala jen hrubá síťovina protáhlých degenerovaných buněk. Prodloužená kultivace nevedla k dalšímu rozvoji cytopatických změn a k úplnému rozrušení buněčné vrstvy.



5. Výška titrů virů VGP v primárních tkáňových kulturách prasečích ledvin

Titry virů se stabilizovaným cytopatickým efektem, tj. plně přizpůsobených k růstu na tkáňových kulturách z primárních prasečích ledvin, se pohybovaly v rozmezí 10^3 až 10^6 a nebyly v podstatě ovlivněny počtem pasáží (obr. 5). Při inokulaci koncentrovanějšího materiálu (10^1 – 10^2) nastupoval cytopatogenní efekt již za 36 až 48 hodin po infekci a za další dva dny byl monolayer téměř úplně rozrušen. Při použití vyšších ředění se změny utvářely pomaleji (třetí až čtvrtý den) a destrukce buněčného porostu se objevily až pátý a šestý den. V některých případech zůstávaly změny v tkáňových kulturách infikovaných nejvyššími ředěními omezeny na utváření hrozníkovitých shluků na povrchu monolayeru, aniž došlo k jeho rozrušení.

4. CYTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ INFIKOVANÝCH TKÁŇOVÝCH KULTUR

V preparátech tkáňových kultur primárních prasečích ledvin barvených hematoxilinem a eosinem jsme zaznamenali degenerativní změny cytoplazmy i jader infikovaných buněk. Jejich tvar byl nepravidelný, cytoplazma se barvila intenzivněji a některé buňky obsahovaly eosinofilní granula různé velikosti. Nejvýraznější změny byly však zjišťovány na jádrech. V průběhu infekce docházelo k jejich svrašťování a ke kondenzaci chromatinu s následným rozpadem jader na chromatinová granula, lokalizovaná nejčastěji ve formě prstence v blízkosti jaderné membrány. Po jejím rozrušení byla mnohočetná chromatinová granula různé velikosti a tvaru nacházena volně v cytoplasmě silně svrašťelých, degenerovaných buněk (obr. 6–9).

Úplná charakteristika těchto virů, jejich biologických a růstových vlastností bude podána v následujících publikacích.

DISKUSE

Gastroenterální onemocnění, označované jako virová gastroenteritida prasat (VGP), jehož výskyt jsme během let 1966–68 zaznamenali v některých chovech v ČSSR, je po stránce klinické a epizootologické totožné s nákazou popisovanou

v zahraničí jako „Transmissible gastroenteritis in Pigs“ (TGE). Nemoc je definována určitým klinickým syndromem, a sice: vodnatým průjmem, zvracením, dehydratací a žíznivostí. Charakteristickým rysem onemocnění je diferencovaná odolnost prasat různých věkových kategorií, která vzrůstá přímo úměrně s jejich stářím. Není vázána na předchozí styk s infekčním agens, ani na přítomnost protilátek, a můžeme ji proto považovat za rezistenci nespecifickou. Tento fakt, který jsme zaznamenali ve všech sledovaných chovech, je v souladu s poznatky zahraničních autorů (Aldásy a kol. 1966, Cartwrightová a kol. 1964, Ditchfield a kol. 1967, Haeltzman 1963, McClurkin a Norman 1966, Noble 1964, Salajka a kol. 1966).

Možnost virové etiologie nákazy naznačili u nás poprvé Salajka a kol. (1966), kterým se podařilo vyvolat enterální onemocnění u zdravých selat perorálním podáním bezbakteriálních filtrátů z orgánů kusů nemocných. Tato metoda byla v diagnostice VGP používána velmi často až do doby, kdy se podařilo izolovat původce nákazy na tkáňových kulturách. Izolační pokusy byly však značně komplikovány existencí necytopatogenních kmenů viru, jejichž pomnožení ve tkáňových kulturách je prokazatelné pouze infekcí vnímavých selat. I naše výsledky naznačují možnost výskytu necytopatogenních agens, protože kmeny, které vyvolávaly cytopatické změny ve tkáňových kulturách, se nám podařilo prokázat pouze v pěti chovech z celkového počtu 15 vyšetřovaných lokalit. Neúspěch kultivace cytopatogenního viru ze všech případů onemocnění je základním prvkem McClurkinovy a Normanovy (1966) teorie o existenci dvou agens spjatých s etiologií VGP.

Charakter cytopatických změn vyvolaných kmeny M-15, M-27, M-29, M-38 a M-42 ve tkáňových kulturách z prasečích ledvin odpovídal změnám popisovaným u ostatních izolátů viru VGP (Cartwrightová a kol. 1965, Ditchfield a kol. 1967, McClurkin a Norman 1966, Welter 1965). Hrozníkovité shluky zakulacených degenerovaných buněk na povrchu monolayeru signalizovaly počátek rozvoje cytopatického efektu, který se později rozšířil a postihoval až 80 % buněčné vrstvy. K prvnímu projevu cytopatických změn docházelo až v páté až sedmé pasáži. Tyto výsledky svědčí o pomalé adaptaci viru VGP na tkáňové kultury z primárních prasečích ledvin. Podobně popisují rozvoj cytopatického efektu McClurkin (1965), Witte a Easterday (1967) a Ditchfield a kol. (1967), kteří zaznamenali první změny v sedmé pasáži. Pouze Harada a kol. (1963) pozorovali náznak efektu již ve třetí a Cartwrightová a kol. (1965) dokonce v první pasáži. Přesně definovatelný cytopatický efekt zaznamenali však i tito autoři až v páté až sedmé pasáži.

Po pomnožení ve tkáňových kulturách z primárních prasečích ledvin kolísá titr viru v poměrně širokém rozmezí od 10^3 do 10^6 TKID₅₀. Tyto naše poznatky jsou v souladu s údaji Cartwrightové a kol. (1965), McClurkina a Normana (1967). Nejdůležitější příčinou těchto diferencí ve výšce titru je fáze růstu, tj. doba po infekci, ve které je virus z tkáňových kultur odebrán, jak o tom svědčí sledování růstové křivky viru VGP (Cartwrightová a kol. 1965, McClurkin a Norman 1966, Harada a kol. 1963 aj.).

V barvených cytologických preparátech tkáňových kultur infikovaných virem VGP jsme na rozdíl od Cartwrightové a kol. (1965) nezaznamenali tvorbu syncytií ani útvarů připomínajících intranukleární inkluze, jak je popisují Ditchfield a kol. (1967). Podle našich poznatků jsou nejdůležitějším příznakem infekce buněk degenerativní změny jader, které spočívají v kondenzaci a pozdějším rozpadu jaderné hmoty do intenzívně modře zbarvených granulí,

kteře se nejčastěji lokalizují v blízkosti jaderné membrány. Podobné změny jader popisuje Mc Clurkin a Norman (1966), Witte a Easterday (1967) a Cartwrightová a kol. (1965).

Děkujeme paní J. Černovské a H. Pospíšilové za technickou spolupráci.

Literatura

- ALDÁSY P. M., MATĚ Z., VANYI A., 1966, Vizsgálók a malacok vírusos hasmánakéről. Maggy. Allator. Lapja. 21: 247-251.
- CARTWRIGHT S. F., HARRIS H. M., BLANDFORD T. B., FINCHAM I., GITTER M., 1964, Transmissible gastroenteritis of swine. Vet. Rec. 76: 1332-1333.
- CARTWRIGHT S. F., HARRIS H. N., BLANDFORD T. B., FINCHAM I., GITTER M., 1965, A cytopathic virus causing a transmissible gastroenteritis in swine. I. Isolation and properties. J. comp. Path. 75: 387-398.
- CARTWRIGHT S. F., 1966, A cytopathic virus causing a transmissible gastroenteritis in swine. II. Biological and serological studies. J. comp. Path. 76: 95-106.
- DITCHFIELD J., PEARCE H. G., JOLLY R. D., CURTIS R. A., 1967, A viral gastroenteritis of Ontario swine. I. Clinical illness and recovery of the virus. Can. J. comp. Med. vet. Sci. 31: 193-197.
- DOYLE L. O., HUTCHINGS L. M., 1946, A transmissible gastroenteritis in pig. J. Am. med. vet. Ass. 108: 257-259.
- DULBECCO R., VOIGT M., 1954, Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. Exper. Med. 99: 167-182.
- ETO M., ICHIHARA I., TSUNODA T., WATANABE L., 1962, Outbreaks of transmissible gastroenteritis among pigs in the Kyushu region. J. Jap. vet. med. Ass. 15: 16-20.
- FEJTENGEJMER V. A., JAMAŠEV S. G., 1966, Epizootologija i klinika infekcionnog gastroenterita svině. Učen. Zap. Kazan. vet. inst. 96: 106-110.
- HAELTERMAN E. O., 1963, Transmissible gastroenteritis of swine. Proc. 17th World. vet. Congr., Hannover, 1: 615-618.
- HARADA K., KUMAGAI T., SASAHARA J., 1963, Cytopathogenicity of TGE virus in pigs. Natn. Inst. Anim. Hlth. Qt. Tokyo. 3: 166-167.
- HARADA K., KUMAGAI T., SASAHARA J., 1967, Studies on transmissible enteritis in pigs. III. Isolation of cytopathogenic virus and its use for serological investigation. Natn. Inst. Anim. Hlth. Qt. Tokyo. 7: 127-137.
- ICHIHARA T., ETO M., ICHIHARA T., WATANABE S., 1964, An epidemic disease in pigs characterised by diarrhoea. II. Identification as Transmissible gastroenteritis and cultivation of the virus. Jap. J. Vet. Sci. 26: 167-169.
- LEE K. M., 1956, Propagation of TGE virus in tissue culture. Ann. N. Y. Acad. Sci. 66: 191-195.
- MC CLURKIN A. W., 1965, Studies on TGE of swine. I. Isolation and identification of a cytopathogenic virus of TGE in primary swine kidney cell cultures. Can. J. comp. Med. vet. Sci. 29: 46-53.
- MC CLURKIN A. W., NORMAN J. O., 1966, Studies on TGE of swine. II. Selected characteristics of cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. Can. J. comp. Med. vet. Sci. 30: 190-198.
- MC CLURKIN A. W., NORMAN J. O., 1967, Studies of transmissible gastroenteritis of swine. III. The effect of selective inhibitors of viral replication on a cytopathogenic virus from transmissible gastroenteritis. Can. J. comp. Med. vet. Sci. 31: 299.
- NIKOLSKIJ V. V., KRASNOBAJEV E. A., 1966, Izučeniye virusa gastroenteriteta svině s ispolzovanijem kultur tkaně. Vopr. Vet. Virusol. 2: 335-346.
- NOBLE W. A., 1964, Methods used to the combat TGE. Vet. Rec. 76: 1497-1498.
- PEHL K. H., BENNDORF E., 1960, Über die Isolierung und die Eigenschaften eines filtrierbaren Agens als Erreger einer senchenhaft auftretenden Gastroenteritis der Schweine im norddeutschen Raum. Arch. exp. Vet. Med. 14: 953-967.
- REED L. J., MUENCH H., 1938, Simple methods of estimating 50 per cent end-points. Am. J. Hyg. 27: 493-497.
- SALAJKA E., GOIŠ M., MENŠÍK J., VYSOUDIL J., 1966, Výskyt infekční virové gastroenteritidy prasat (TGE) v ČSSR. Veterinářství 16: 97-103.

- WELTER C. J., 1965, TGE of swine. I. Propagation of virus in cell cultures and development of a vaccine. Vet. Med. Small Anim. Clin. 60 : 1054-1058.
- WITTE K. H., EASTERDAY B. C., 1967, Isolation and propagation of the virus of transmissible gastroenteritis of pigs in various pig cell cultures. Arch. ges. Virusforsch. 20 : 327-350.

Došlo dne 29. 7. 1969

ШТЕПАНЕК Й., МЕСАРОШ Э., ПОСПИШИЛ З. (НИИ ветеринарии, Брно, Чехословакия). Изоляция цитопатогенных штаммов возбудителя вирусного гастроэнтерита свиней в тканевых культурах. Вет. Мед. (Прага) 14 (12) : 665-674, 1969.

Вирусные штаммы были изолированы из тонких кишок и помета явно клинически больных поросят в возрасте до 10 дней в 5 местах установления ВГС. Штаммы размножались в тканевых культурах из первичных свинных почек, где цитопатические изменения появились на 6—8 пассаже. Продолжительность необходимого для их образования инкубационного периода зависела от количества вирусов в посеве. В первые дни после заражения цитопатический эффект характеризовался образованием совокупностей округленных дегенерированных клеток на поверхности монослоя. Более отчетливые цитопатические изменения появились на третий—пятый день после заражения. В тканевых культурах из первичных свинных почек вирусы достигали титра 10^5 — 10^6 TKID₅₀. При цитологическом исследовании зараженных тканевых культур самые значительные изменения установлены в печени. Наблюдалась конденсация, а позже и распад ядерного хроматина. Хроматиновые гранулы локализовались в форме кольца вблизи ядерной мембраны. Не наблюдалось ни синцитий, ни интрануклеарных или интрацитоплазматических инклюзий.

вирусный гастроэнтерит свиней; изоляция вируса; тканевые культуры; цитопатический эффект; титрация вируса; цитологические изменения

ŠTĚPÁNEK J., MESÁROŠ E., POSPÍŠIL Z. (Research Institute of Veterinary Medicine, Brno, Czechoslovakia). The Isolation of the Cytopathogenic Strains of the Originator of Transmissible Gastroenteritis of Pigs in Tissue Cultures. Vet. Med. (Praha) 14 (12) : 665-674, 1969.

Virus strains were isolated from the small intestines and excrements of obviously clinically diseased piglets up to the age of 10 days, from five localities of the occurrence of VGP. The virus strains were multiplied in the tissue cultures from primary pig kidneys with the production of cytopathic changes occurring during the sixth to eighth passage. The incubation period, necessary for the changes to occur, varied with the quantity of the virus in the inoculum. During the first days after infection, the cytopathic effect was characterized by the production of the clusters of round degenerated cells on the surface of the monolayer. More pronounced cytopathic changes appeared on the third to fifth day from infection. In the tissue cultures of the primary pig kidneys, the viruses reached a titre from 10^5 to 10^6 TKID₅₀. A cytological examination of the infected tissue cultures was used to demonstrate the most pronounced changes in nuclei. Condensation and — in the later stages — decomposition of chromatin was observed. The chromatin granule was located in the form of a ring near the nuclear membrane. Neither syncytia, nor intranuclear or intracytoplasmatic inclusions were observed.

transmissible gastroenteritis of pigs; virus isolation; tissue cultures; cytopathic effect; titration of virus; cytological changes

ŠTĚPÁNEK J., MESÁROŠ E., POSPÍŠIL Z. (Forschungsinstitut der Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). Die Isolierung von zytopathogenen Stämmen des Erregers der virusbedingten Gastroenteritis bei Schweinen in Gewebekulturen. Vet. Med. (Praha) 14 (12) : 665-674, 1969.

Aus den Dünndärmen und dem Kot der offensichtlich klinisch kranken Ferkel im Alter bis zu 10 Tagen, sind von 5 Lokalitäten des VGP-Vorkommens die Virusstämme isoliert worden. Sie vermehrten sich in Gewebekulturen aus den primären Nieren bei Schweinen mit der Bildung von zytopathischen Veränderungen, die während der 6. bis 8. Passage erschienen haben. Die Inkubationsperiode, die zur Bildung dieser Veränderungen nötig ist, schwankt in Abhängigkeit von der Menge der Viren

in Inokulum. In den ersten Tagen nach der Infektion wurde der zytopathische Effekt durch Bildung der Anhäufungen von gerundeten, degenerierten Zellen auf der Monolayeroberfläche charakterisiert. Ausgeprägte zytopathische Veränderungen sind erst am 3. bis 5. Tag nach der Infektion erfolgt. In den Gewebekulturen der Schweinenieren betrug der Titer 10^5 bis 10^6 TKID₅₀. Durch zytologische Untersuchung der infizierten Gewebekulturen sind die ausgeprägtesten Veränderungen in der Leber festgestellt worden. Es kam zur Kondensation und später zum Zerfall von Kernchromatin. Die Chromatingranulen lokalisierten sich ringförmig in der Nähe von der Kernmembrane. Synzytien, intranukleare oder intrazytoplasmatische Inklusionen sind nicht beobachtet worden.

virusbedingte Gastroenteritis der Schweine; Virusisolierung; Gewebekulturen; zytopathischer Effekt; Virustitration; zytologische Veränderungen

Adresa autorů:

MVDr. J. Štěpánek, MVDr. E. Mesároš, CSc., MVDr. Z. Pospíšil, CSc.,
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno - Medlánky

POROVNÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOSTI IN VITRO ŠESTI LÉKŮ, DOPORUČOVANÝCH K LÉČBĚ PRŮJMŮ TELAT

J. Bartoš

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

BARTOŠ J. Porovnání antimikrobiální účinnosti in vitro šesti léků, doporučených k léčbě průjmů telat. Vet. Med. (Praha) 14 (12): 675-685, 1969.

Porovnávali jsme antimikrobiální účinnost šesti léků, doporučených u nás i v zahraničí pro léčbu průjmů telat na kmenech *E. coli*, pocházejících z telat (77 kmenů), zajíců (40 kmenů) a bažantů (39 kmenů). Kmeny *E. coli* z telat pocházely z chovů, kde se podávaly střídavě Streptonamid, Antirhoin a Vitalin. Rozdíly v citlivosti kmenů *E. coli* z telat a z lovné zvěře jsou nejzřetelnější u léků, jimiž byla telata léčena. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) léků pro kmeny *E. coli* z telat (v závorkách pro kmeny z lovné zvěře) byly v $\mu\text{g/ml}$ tyto:

Streptonamid	3,9—128000 $\mu\text{g/ml}$	(3,9— 15,6 $\mu\text{g/ml}$)
Antirhoin	125 — 4000 $\mu\text{g/ml}$	(15,6— 125 $\mu\text{g/ml}$)
Vitalin	2000 — 16000 $\mu\text{g/ml}$	(1000 —4000 $\mu\text{g/ml}$)
Dietan	250 — 1000 $\mu\text{g/ml}$	(250 —1000 $\mu\text{g/ml}$)
Rhodovet	2000 — 8000 $\mu\text{g/ml}$	(1000 —4000 $\mu\text{g/ml}$)

Noticin nepůsobil in vitro bakteriostaticky ani při koncentraci 64000 $\mu\text{g/ml}$. Urogran-Spofa působil při této koncentraci bakteriostaticky na 97,4 % kmenů. Při podávání jednotlivé terapeutické dávky Dietanu, Antirhoinu, Streptonamidu nebo Vitalinu by se při příjmu jednoho litru tekutiny vytvořily v zažívacích koncentrace, které by inhibovaly tato procenta kmenů *E. coli* pocházejících z telat: 100 % při podání Dietanu, 100 % při Antirhoinu, 92,3 % při Streptonamidu a 32,5 % při aplikaci Vitalinu.

telata; průjmy; *E. coli*; Streptonamid; Antirhoin; Vitalin; Dietan; Rhodovet; Noticin; rezistence k lékům

V našich předchozích pracích jsme sledovali in vitro antimikrobiální účinnost jednotlivých léků samotných, např. streptomycinu, chlortetracyklinu (Bartoš, Lebeduška 1968a), nitrofurantoinu — zahraničního Furadantinu (Bartoš 1963) proti kmenům *E. coli* z telat. Nitrofurantoin samotný byl též velmi účinný v terapii gastroenteritid telat (Bartoš, Lebeduška, Gilka 1963). V současné době Bioveta Nitra vyrábí přípravek Antirhoin, který obsahuje vedle nitrofurantoinu a chlortetracyklinu též další komponenty.

Účelem práce bylo porovnat antimikrobiální účinnost šesti přípravků, většinou kompozitních (se všemi přídatnými složkami), tedy účinnost každého léku jako celku. Tyto zkoušky celých přípravků nám sloužily jako model pro podmínky v zažívacím traktu, které jsou ovšem ještě podstatně složitější. Množství přípravků do agaru jsme volili tak, abychom dosáhli zástavy růstu a výpočtem jsme odvozovali, zda zjištěná bakteriostatická koncentrace odpovídá přibližně té koncentraci léčiva, která vznikne v zažívacích po aplikaci doporučené terapeutické dávky v jednom až dvou litrech podané tekuté potravy

(mléko, čaj). Dále jsme si vytkli za úkol porovnat účinnost jednotlivých přípravků na *E. coli* pocházející z telat s citlivostí na *E. coli* z lovné zvěře, o níž jsme věděli, že neměla přístup k látkám, obsaženým ve studovaných přípravcích.

MATERIÁL A METODIKA

Kmeny *E. coli* jsme izolovali z rektálních výtěrů telat s průjmy ze tří různých zemědělských závodů, v nichž se používaly nepravdělně, střídavě, mnohdy i současně ve stejném chovu tři léky: Streptonamid, Antirhoin a Vitalin. Dále jsme izolovali kmeny *E. coli* z bažantů a zajíců. Kmeny jsme zařazovali jako *E. coli* na základě kultivačních a biochemických vlastností podle Sedláka a Rischeho (1961). Celkem jsme izolovali 77 kmenů *E. coli* z telat, 40 kmenů ze zajíců a 39 kmenů z bažantů. Testování citlivosti na kmenech z lovné zvěře jsme volili z toho důvodu, abychom mohli porovnat citlivost kmenů *E. coli* z telat s původní kmenovou citlivostí *E. coli*, která se uchovává v případě antibiotik tetracyklinové řady pouze u lesní a polní zvěře, vzdálené od hospodářských objektů, jak jsme zjistili v předchozí práci (Bartoš, Lebduška 1968b). Představují tudíž kmeny z bažantů a zajíců kontrolní skupinu s původní kmenovou citlivostí, s níž je možno srovnávat změny citlivosti vznikající při klinickém podávání léků zvířatům.

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) jednotlivých přípravků jsme zjišťovali kvantitativní plotnovou metodou. Léčiva jsme navažovali na sterilní Petriho misky a zalévali agarem ve složení doporučeném Výmolou a Hejzlarem (1964). Rozptýlení, popřípadě rozpuštění prášků na plotnách bylo zhruba stejnoměrné s výjimkou Vitalinu, u kterého se v nejvyšších koncentracích tvořily v některých místech bodové shluky nebo i větší hrudky, na které ovšem nebyla nanášena kultura. U Dietanu při použitých koncentracích byly patrné drobné nerozpustné kousky celkem stejnoměrně rozptýlené. Ředěnou bujónovou kulturu zkoušených kmenů jsme nanášeli na plotny bakteriologickou kličkou paprskovitě v přesných čarách o délce 1 cm. Tím bylo možno kontrolovat, zda růst nastal na naočkovaných čarách nebo mimo ně, k čemuž však nedocházelo. Námi zvolená metoda byla pro daný typ pokusů vhodnější než metoda zkumavková, neboť může lépe rozlišit případné kontaminace. Opakovány byly ty pokusy, při nichž docházelo k růstu mikrobů na plotnách s nejvyššími koncentracemi léčiv, aby se tak znovu ověřil výskyt kmenů s nejvyšší rezistencí k jednotlivým léčivům. Z tuzemských přípravků jsme testovali:

Streptonamid (*Streptomycinum sulfuricum* 1 000 000 m. j., *phthalylsulfathiazolum* 1 g v 1 sáčku), výrobek n. p. Léčiva Praha.

Antirhoin (Nitrofurantoin 400 mg, chlortetracyklin 750 mg, vitamín A 100 000 m. j., vitamín E 30 mg, glukóza ad 25 g), vyrábí Bioveta Nitra.

Vitalin připravil a distribuuje MVDr. Zrůnek, ředitel OVZ Hodonín. Obsahuje: Sulfadimidin Spofa pulv. solubile 200 g, *Mucogel siccum* 200 g, *Acipepsol tabul. (pulveratus)* 20 g, Tannofil 100 g.

Dietan — protiprůjmový koncentrát pro telata. Vyrábí Výzkumné středisko pro biofaktory ve výživě zvířat, Horní Počernice u Prahy, poloproduktový vývojový závod Kouřim. Složení vývojového přípravku udáno není. Štrosová, Müller, Dřevjanský (1968) uvádějí, že podstatnými složkami přípravku jsou: lněné semeno, heřmánek a dubová kůra.

Ze zahraničních přípravků, u nás v léčbě průjmů telat nepoužívaných, jsme testovali:

Rhodovet-Pulver (Octa-methenamin-octa-hydrorhodanid-ammonium-sulfat), vyrábí VEB Serum-Werk Bernburg, NDR a

Noticin (2-Thion-3,5-dibenzyl-tetrahydro-1,3,5-thiadiazin 99,4 g, detergenty a constituens ad 100 g), vyrábí VEB Farbenfabrik Wolfen, NDR.

VÝSLEDKY

Na prvním místě uvádíme MIC jednotlivých léků, které byly zjištěny u kmenů *E. coli* z lovné zvěře, poněvadž u ní je zachována původní citlivost. Ty pak srovnáváme s citlivostí kmenů *E. coli* z telat, pocházejících ze tří družstev, v nichž se podávaly: Streptonamid, Antirhoin a Vitalin. Další léky: Dietan, Rhodovet a Noticin v chovech podávány nebyly.

Citlivost k Streptonamidu uvádí tab. I. Všechny kmeny *E. coli* izolované z bažantů a zajíců byly citlivé ke koncentracím od 3,9 $\mu\text{g/ml}$ do 15,6 $\mu\text{g/ml}$. Stejnou citlivost jako 100 % kmenů z lovné zvěře mělo pouze 48,1 % kmenů izolovaných z telat. Do MIC 1000 $\mu\text{g/ml}$ bylo inhibováno v růstu 89,7 % kmenů a do MIC 2000 $\mu\text{g/ml}$ 92,3 % kmenů *E. coli* z telat. Zbytek, tj. 7,8 % kmenů, bylo inhibováno teprve vyššími koncentracemi, pět kmenů bylo inhibováno až při 128000 μg Streptonamidu v 1 ml. Výskyt rezistence kmenů *E. coli* z telat je zde nepochybně ve vztahu k používání tohoto přípravku při léčbě průjmů telat.

I. Citlivost kmenů *E. coli* z telat, bažantů a zajíců k Streptonamidu

MIC $\mu\text{g/ml}$	Kmeny <i>E. coli</i>					
	z telat		z bažantů		ze zajíců	
	počet	%	počet	%	počet	%
3,9	6	7,8	5	12,8	2	5,0
7,8	8	10,4	15	38,5	25	62,5
15,6	23	29,9	19	48,7	13	32,5
31,2	2	2,6				
62,5	2	2,6				
125	3	3,9				
250	7	9,1				
500	12	15,6				
1000	6	7,8				
2000	2	2,6				
4000						
8000	1	1,3				
16000						
32000						
64000						
128000	5	6,5				

II. Citlivost kmenů *E. coli* z telat, bažantů a zajíců k Antirhoinu

MIC μg/ml	Kmeny <i>E. coli</i>					
	z telat		z bažantů		ze zajíců	
	počet	%	počet	%	počet	%
15,6			3	7,7	6	15,0
31,2			5	12,8	6	15,0
62,5			12	30,8	20	50,0
125	4	5,2	19	48,7	8	20,0
250	2	2,6				
500	16	20,8				
1000	36	46,8				
2000	11	14,3				
4000	8	10,4				

III. Citlivost kmenů *E. coli* z telat, bažantů a zajíců k Vitalinu

MIC μg/ml	Kmeny <i>E. coli</i>					
	z telat		z bažantů		ze zajíců	
	počet	%	počet	%	počet	%
1000					8	20,0
2000	2	2,6	11	28,2	12	30,0
4000	23	29,9	28	71,8	20	50,0
8000	47	61,0				
16000	5	6,5				

Citlivost k Antirhoinu uvádí tab. II. Kmeny *E. coli* izolované z bažantů a zajíců byly vesměs citlivé ke koncentracím od 15,6 do 125 μg/ml. Stejnou citlivost jako 100 % kmenů z lovné zvěře mělo pouze 5,2 % kmenů izolovaných z telat. K inhibici ostatních kmenů bylo zapotřebí vyšších koncentrací, v některých případech až do 4000 μg/ml. Rovněž při léčbě Antirhoinem pozorujeme veliké zvýšení odolnosti kmenů *E. coli* k tomuto léku proti kmenům pocházejícím z lovné zvěře.

Citlivost kmenů *E. coli* k Vitalinu (tab. III) byla všeobecně nižší. MIC u bažantů a zajíců se pohybovaly od 1000 μg/ml do 4000 μg/ml. Stejnou citlivost jako 100 % kmenů z lovné zvěře mělo pouze 32,5 % kmenů izolovaných z telat. K inhibici ostatních kmenů bylo zapotřebí vyšších koncentrací, tj. 8000 až 16000 μg/ml. Toto zjištění poukazuje na poněkud sníženou citlivost kmenů *E. coli* z telat, léčených Vitalinem, k tomuto přípravku.

Citlivost kmenů *E. coli* k Dietanu uvádí tab. IV. Všechny kmeny *E. coli* izolované z bažantů a zajíců byly citlivé ke koncentracím od 250 μg/ml do

1000 $\mu\text{g/ml}$. Stejnou citlivost jako 100 % kmenů z lovné zvěře mělo i 100 % kmenů z telat. Kmeny *E. coli* z telat pocházely z družstev, kde se tento přípravek nepodařilo. Neprojevilo se téměř rozdíly mezi účinností na kmeny *E. coli* různého původu.

K Rhodovetu, který se v Československu k léčbě telat nepoužívá, byl rozsah citlivosti kmenů *E. coli* z různých druhů zvířat téměř stejný (tab. V). MIC u kmenů z bažantů a zajíců se pohybovaly od 1000 $\mu\text{g/ml}$ do 4000 $\mu\text{g/ml}$, u kmenů z telat pak od 2000 $\mu\text{g/ml}$ do 8000 $\mu\text{g/ml}$.

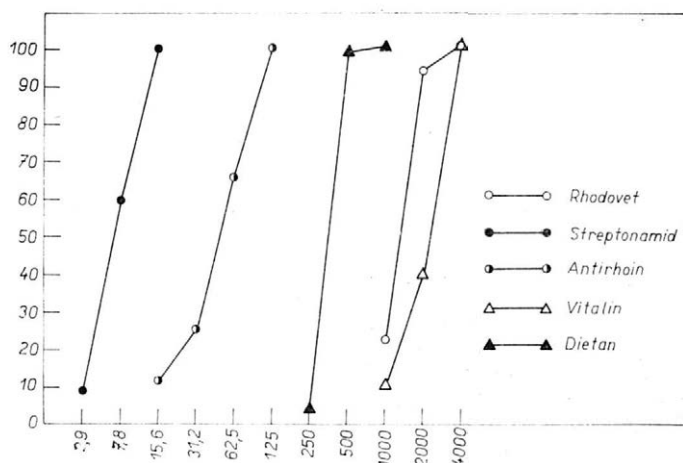
IV. Citlivost kmenů *E. coli* z telat, bažantů a zajíců k Dietanu

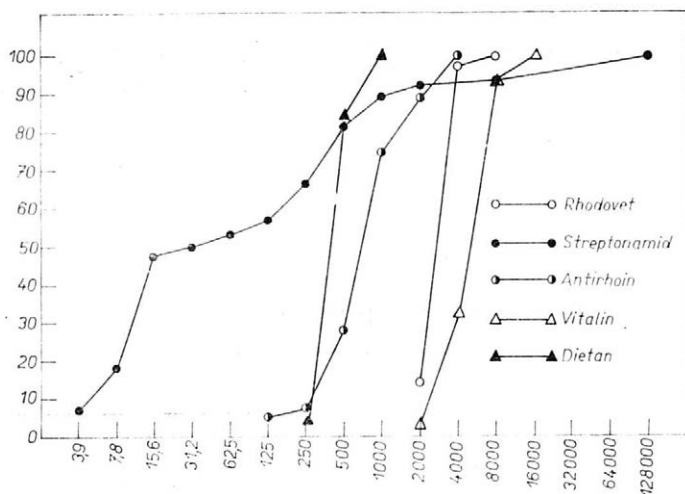
MIC $\mu\text{g/ml}$	Kmeny <i>E. coli</i>					
	z telat		z bažantů		ze zajíců	
	počet	%	počet	%	počet	%
250	3	3,9	1	2,6	2	5,0
500	62	80,5	38	97,4	37	92,5
1000	12	15,6			1	2,5

V. Citlivost kmenů *E. coli* z telat, bažantů a zajíců k Rhodovetu

MIC $\mu\text{g/ml}$	Kmeny <i>E. coli</i>					
	z telat		z bažantů		ze zajíců	
	počet	%	počet	%	počet	%
1000			13	33,3	5	12,5
2000	11	14,3	22	56,4	34	85,0
4000	65	84,4	4	10,3	1	2,5
8000	1	1,3				

1. Citlivost kmenů *E. coli* z lovné zvěře k studovaným léčivům
osa x — minimální inhibiční koncentrace léčiv v $\mu\text{g/ml}$
osa y — procento kmenů *E. coli*





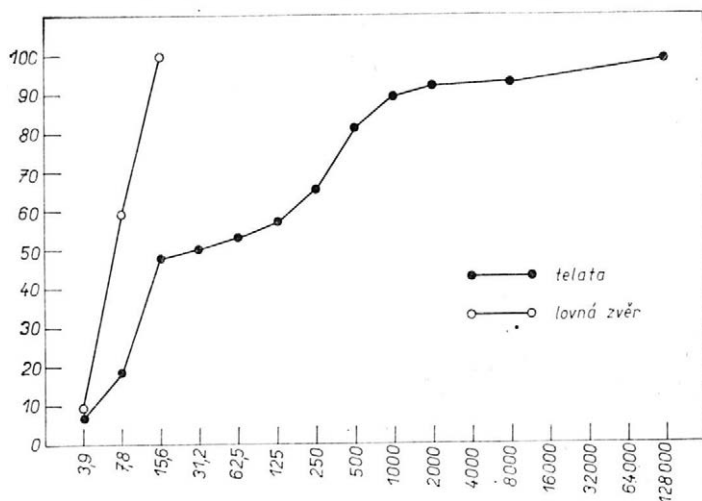
2. Citlivost kmenů *E. coli* z telat k studovaným léčivům
osa x — minimální inhibiční koncentrace léčiv v µg/ml
osa y — procento kmenů *E. coli*

Při testování citlivosti kmenů *E. coli* z bažantů, zajíců a telat k Notcinu jsme *in vitro* nezjistili antimikrobiální účinek ani při koncentraci 64000 µg/ml. Naproti tomu Urogran-Spofa působil při této koncentraci bakteriostaticky na 97,4 % kmenů ze 77 kmenů *E. coli* izolovaných z telat.

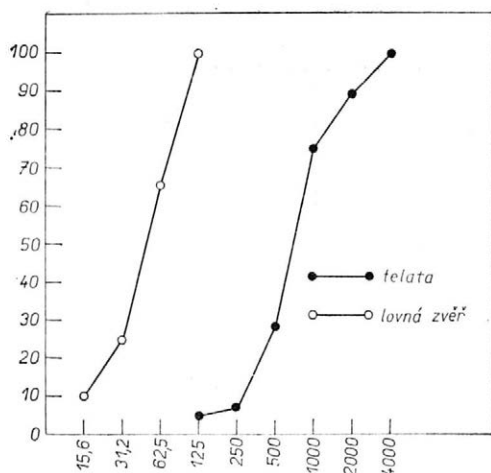
Porovnáme-li účinnost testovaných přípravků pouze z hlediska kmenů *E. coli* pocházejících z bažantů a zajíců, vidíme z obr. 1, že nejúčinnější byl Streptonamid, dále následovaly: Antirhoin, Dietan, Rhodovet a Vitalin.

Obr. 2 zobrazuje účinnost léků na kmeny *E. coli* pocházející z telat, která dostávala v chovech Streptonamid, Antirhoin a Vitalin. Z hlediska účinnosti na 100 % testovaných kmenů (ED₁₀₀) byl nejúčinnější Dietan (1000 µg/ml), pak následovaly: Antirhoin (4000 µg/ml), Rhodovet (8000 µg/ml), Vitalin (16000 µg/ml) a nakonec Streptonamid (128000 µg/ml). V další části práce uvádíme jen výsledky dosažené s těmi léčivy, která byla podávána telatům v chovech, z nichž pocházely studované kmeny *E. coli*.

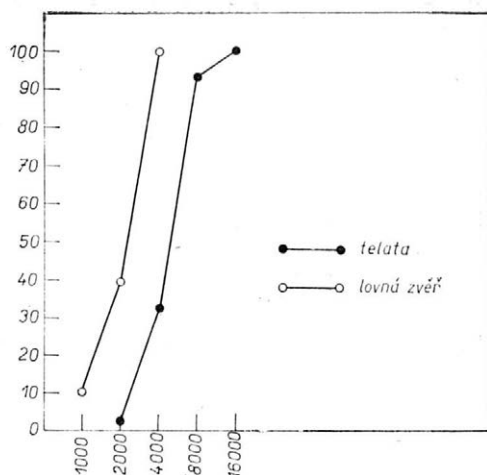
Obr. 3 až 5 porovnávají rozsah rezistence kmenů *E. coli* pocházejících z telat s rozsahem rezistence kmenů *E. coli* z lovné zvěře. Odečteme-li od minimální



3. Citlivost kmenů *E. coli* z telat a lovné zvěře (bažanti a zajáci) k Streptonamidu
osa x — minimální inhibiční koncentrace Streptonamidu v µg/ml
osa y — procento kmenů *E. coli*



4. Citlivost kmenů *E. coli* z telat a lovné zvěře (bažanti a zajáci) k Antirrhoinu
osa x — minimální inhibiční koncentrace Antirrhoinu v $\mu\text{g/ml}$
osa y — procento kmenů *E. coli*



5. Citlivost kmenů *E. coli* z telat a lovné zvěře (bažanti a zajáci) k Vitalinu
osa x — minimální inhibiční koncentrace Vitalinu v $\mu\text{g/ml}$
osa y — procento kmenů *E. coli*

inhibiční koncentrace, při níž došlo k bakterioostázi všech kmenů *E. coli* z telat, minimální inhibiční koncentraci, při níž došlo k bakterioostázi všech kmenů *E. coli* z lovné zvěře, zjistíme, že rozdíl je největší u Streptonamidu ($127984,4 \mu\text{g/ml}$), pak by následoval Vitalin ($12000 \mu\text{g/ml}$) a nakonec Antirrhoin ($3875 \mu\text{g/ml}$). To znamená, že vývoj rezistence co do výše MIC pokročil nejdále u Streptonamidu, pak u Vitalinu a nejméně u Antirrhoinu.

Při testování Vitalinu jsme pozorovali velmi často částečnou inhibici, což se projevovalo sníženým počtem kolonií, které byly velmi drobné, avšak makroskopicky ještě patrné. Poněvadž při posuzování výsledků testů citlivosti platí, že za MIC se má považovat taková koncentrace, při níž není makroskopicky patrný růst (V ý m o l a a H e j z l a r 1964), museli jsme i velmi drobné kolonie, mnohdy na hranici patrnosti, hodnotit jako růst. Při testování ostatních přípravků jsme tento jev nepozorovali.

DISKUSE

Význam testování celých přípravků na antimikrobiální účinnost spočívá v tom, že tyto testy jsou bližší praktickým podmínkám, než když se testuje jen jedna složka přípravku, a to ještě ve formě standardního vzorku. Dá se předpokládat, že účinnost standardu bude vyšší, než účinnost antibiotika obsaženého v léčivu, protože ve směsném přípravku bude váhové množství antibiotika méně přesné, jeho účinnost může být ovlivněna ostatními přísadami a konečně snad i účinnost antibiotického přípravku samotného použitého pro tyto účely nemusí být optimální. Tuto okolnost jsme zjistili dokonce i u injekčního přípravku chlortetracyklinu (B a r t o š, L e b d u š k a, H o r á k o v á, M a t o u š k o v á 1967). Tím větší může být rozdíl účinnosti u neinjekčních přípravků, určených pro perorální použití u zvířat. Nevýhoda testování celých přípravků spočívá v tom, že je nutno testovat přípravek přímo, tj. nesterilní, jelikož teplem se mohou některé látky rozkládat, čímž by se snížila účinnost; sterilizace filtrací je nepoužitelná. K experimentálnímu ověření, zda za podmí-

VI. Doporučované jednotlivé dávky léčiv a jejich teoretické koncentrace v zažívacím traktu telat

Lék	Dávka	Průměrná váha dávky přípravku v gramech	Koncentrace léčiva v 1 ml při příjmu tekutiny	
			1 litr	2 litry
Streptonamid	1 sáček denně	2,7	2700 $\mu\text{g/ml}$	1350 $\mu\text{g/ml}$
Antirhoin	1 sáček denně	24,5	24500 $\mu\text{g/ml}$	12250 $\mu\text{g/ml}$
Vitalin	2 vrchovaté kávové lžičky 2 $\times$ denně	5,0	5000 $\mu\text{g/ml}$	2500 $\mu\text{g/ml}$
Dictan	25,0 g	25,0	25000 $\mu\text{g/ml}$	12500 $\mu\text{g/ml}$

nek našich pokusů mohl nastat růst na nenaočkovaných plotnách následkem přidání nesterilizovaného přípravku, dělali jsme kontroly, v nichž všechny koncentrace léčiv byly přidávány do používané půdy bez inokulace námi studovaných kultur. V případě kontaminací byly pokusy opakovány a za konečný výsledek byl považován pak výsledek z toho vzorku léčiva, kdy kontrolní plotny byly sterilní.

Účinnost přípravků můžeme hodnotit dvojím způsobem. Jednak z hlediska citlivosti kmenů *E. coli*, na něž dosud léky nepůsobily, a dále z hlediska citlivosti kmenů *E. coli*, izolovaných z telat, která byla již těmito léčivy léčena. Prvý způsob hodnocení ukazuje, jaké dávky, resp. koncentrace léků by bylo účelné podávat v těch chovech, kde se lék ještě nepoužíval a kde se tedy nepočítá s možností vzniku rezistence. Druhý způsob hodnocení je daleko přísnější, neboť zásadně počítá s možností vzniku rezistence. Všechna nově zaváděná léčiva by tedy měla být testována obojím způsobem.

K vlastním výsledkům je možno připojit tyto úvahy: z hlediska praxe je nejzajímavější otázka, zda terapeuticky používaná dávka přípravku podaná nemocnému teleti v jednom až dvou litrech tekutiny působí v tomto objemu bakteriostaticky. Pro přípravek, který se podává jen jedenkrát denně, platí tento výpočet pouze pro to krmení, při němž byl podán lék, kdežto u krmení dalších — bez současné aplikace léčiva — budou ovšem koncentrace nepoměrně nižší, nebo se budou blížit nulovým hodnotám vlivem průchodu a posunu léčiva do nižších částí střeva, popřípadě i vlivem vstřebání některých složek léků.

Tabulka VI udává přibližné koncentrace jednotlivých léků, které se teoreticky vytvářejí v zažívacím traktu telat po příjmu dávky jednoho až dvou litrů tekutiny. Porovnáme-li tuto tabulku s tabulkami I—V, dostaneme tyto výsledky:

Když bychom podali teleti Streptonamid se dvěma litry tekutiny, vytvořila by se koncentrace, která by inhibovala asi 89,7 % kmenů *E. coli*. Při podání stejné dávky Streptonamidu, ale při menším množství tekutiny, tj. jednoho litru, by bylo inhibováno 92,3 % kmenů *E. coli* izolovaných z telat.

Při podání Antirhoinu s jedním i se dvěma litry tekutiny by se vytvořily v zažívacím traktu koncentrace 24500 a 12250 $\mu\text{g/ml}$, které by inhibovaly

100 % kmenů *E. coli* izolovaných z telat. Tyto koncentrace jsou třikrát až šestkrát vyšší než koncentrace, které působily inhibici 100 % kmenů *E. coli*, tj. 4000 $\mu\text{g/ml}$. Hlavní antimikrobiální komponentou Antirhoinu bude nitrofurantoin a nikoliv chlortetracyklin, neboť v našich předchozích pokusech (Bartoš, Lebduška 1968a) jsme zjistili značně vysokou rezistenci kmenů *E. coli* izolovaných z telat různých zemědělských závodů k chlortetracyklinu.

Při podání Vitalinu (dvě vrchovaté kávové lžičky) a dvou litrů tekutiny by se vytvořila koncentrace, která by působila přibližně na 2,6 % kmenů z telat a na 39,2 % kmenů z lovné zvěře. Při podání stejné dávky, ale při omezení tekutiny na jeden litr vznikla by koncentrace, která by působila na 32,5 % kmenů z telat a na 100 % kmenů z lovné zvěře.

Při podání jedné dávky Dietanu, tj. 25 g, by se při příjmu jednoho litru tekutiny vytvořila koncentrace 25000 $\mu\text{g/ml}$, při příjmu dvou litrů by vznikla koncentrace 12500 $\mu\text{g/ml}$. Tyto koncentrace přesahují 12 až 25násobně koncentraci nutnou k inhibici růstu mikrobů (1000 $\mu\text{g/ml}$). To znamená, že by se vytvořily koncentrace, které by bezpečně inhibovaly 100 % kmenů *E. coli* jak z lovné zvěře, tak i z telat. U tohoto přípravku by bylo nutno dále sledovat, zda při dlouhodobém podávání telatům v chovech nevznikne návyk mikrobů k tomuto léku. Za jednoho z možných nositelů antimikrobiální účinnosti bychom mohli považovat lněné semínko, neboť v něm bylo nedávno zjištěno nové antibiotikum linatin, vysoce účinné proti gramnegativním tyčinkám (Feedstuffs 39, 1967, č. 45, s. 74).

Z porovnání koncentrací dosažených v zažívadlech po jedné dávce léku a zjištěných antimikrobiálních koncentrací by byl neúčinnější Dietan (nebyl však podáván telatům), následoval by Antirhoin, Streptonamid. Nejmenší antimikrobiální účinnost by vykázal Vitalin. Při dávkování 25 g Dietanu, nebo jednoho sáčku Antirhoinu, nebo jednoho sáčku Streptonamidu, nebo dvou vrchovatých kávových lžiček Vitalinu by se při příjmu jednoho litru tekutiny vytvořily v zažívadlech takové koncentrace, které by inhibovaly 100 % kmenů při podání Dietanu, 100 % při podání Antirhoinu, 92,3 % kmenů při podání Streptonamidu a 32,5 % kmenů při podání Vitalinu. Kmeny pro toto hodnocení pocházely z telat, která byla léčena Streptonamidem, nebo Antirhoinem, nebo Vitalinem. Kdybychom pro stejné hodnocení použili kmenů z lovné zvěře, pak by koncentrace dosažené v zažívadlech při výše uvedeném dávkování působily na 100 % kmenů při podání všech čtyř jednotlivých léků: Dietanu, Antirhoinu, Streptonamidu a Vitalinu.

Účinnost *in vitro* s koncentrací dosažitelnou v zažívacím traktu u telat nelze srovnat u Rhodovetu a Noticinu, u nichž se antimikrobiálně účinné složky mají uvolňovat až při jejich rozkladu v zažívadlech, resp. v těle.

Za technickou spolupráci děkujeme B. Seidlové.

Literatura

- BARTOŠ J., 1963, Účinek některých antibiotik a chemoterapeutik na kmeny *Escherichia coli* izolované z nemocných nebo uhynulých telat. Věstník výzk. úst. zem., 10 : 210-212.
- BARTOŠ J., LEBDUŠKA J., GILKA F., 1963, Účinnost furazolidonu a Furantoinu při léčbě toxické dyspepsie novorozeneých telat. Věstník výzk. úst. zem., 10 : 465-469.
- BARTOŠ J., LEBDUŠKA J., HORÁKOVÁ V., MATOUŠKOVÁ O., 1967, Příspěvek k testování citlivosti mikrobů k antibiotikům. Veterinářství 17 : 552-556.

- BARTOŠ J., LEBDUŠKA J., 1968a, Vývoj rezistence a polyrezistence *E. coli* z novorozených telat v letech 1962—1964 vzhledem k léčbě. Vet. Med. (Praha) 13, 10: 527-536.
- BARTOŠ J., LEBDUŠKA J., 1968b, Citlivost kmenů *E. coli* z broilerů, bažantů a zaičů k tetracyklinům, streptomycinu a chloramfenikolu. Vet. Med. (Praha) 13, 11-12: 593-600.
- SEDLÁK J., RISCHE H., 1961, Enterobacteriaceae-Infektionen, Leipzig.
- ŠTROSOVÁ J., MÜLLER Z., DŘEVJANÝ L., 1968, Galavitán — směs tuku a emulgátoru obohacená biofaktory — nová náhrada mléčného tuku pro výživu telat. Biol. Chem. Výživy 4, 2: 119-125.
- VÝMOLA F., HEJZLAR M., 1964, Kvantitativní zkoušky citlivosti mikrobů na antibiotika. Čs. Epidem. Mikrob. Imun. 13: 112-120.

Došlo dne 29. 7. 1969

БАРТОШ Й. (НИИ ветеринарии, Брно, Чехословакия). Сравнение антимикробного действия *in vitro* шести медикаментов, рекомендуемых для лечения поносов телят. Vet. Med. (Praha) 14 (12): 675-685, 1969.

Сравнивали антимикробное действие шести медикаментов, рекомендуемых в Чехословакии и за границей для лечения поносов телят, на штаммах *E. coli*, происходящих от телят (77 шт.), зайцев (40 шт.) и фазанов (39 шт.). Телячьи штаммы *E. coli* происходили из стад, где в чередующемся порядке вводили Стрептонамид, Антироин и Виталин. Разница в чувствительности штаммов *E. coli* телят и охотничьей дичи наиболее отчетлива у медикаментов, которыми лечили телят. Минимальные замедлительные концентрации (МЗК) лекарств для штаммов *E. coli* телят (в скобках для штаммов охотничьей дичи) в $\mu\text{g/ml}$ следующие:

Стрептонамид	3,9—128000 $\mu\text{g/ml}$ (3,9— 15,6 $\mu\text{g/ml}$)
Антироин	125 — 4000 $\mu\text{g/ml}$ (15,6— 125 $\mu\text{g/ml}$)
Виталин	2000 — 16000 $\mu\text{g/ml}$ (1000 —4000 $\mu\text{g/ml}$)
Диетан	250 — 1000 $\mu\text{g/ml}$ (250 —1000 $\mu\text{g/ml}$)
Родовет	2000 — 8000 $\mu\text{g/ml}$ (1000 —4000 $\mu\text{g/ml}$)

Нотицин *in vitro* не оказал бактериостатического действия даже в концентрации 64000 $\mu\text{g/ml}$. Урогран-Спофа действовал в такой же концентрации бактериостатически на 97,4 % штаммов. При подаче отдельной терапевтической дозы Диетана, Антироина, Стрептонамида или Виталина при приеме 1 л в органах пищеварения образовались бы концентрации, которые замедляли бы следующие проценты штаммов *E. coli*, происходящих от телят: 100 % при даче Диетана, 100 % Антироина, 92,3 % — Стрептонамида и 32,5 % — Виталина.

телята; поносы; *E. coli*; Стрептонамид; Антироин; Виталин; Диетан; Родовет; Нотицин; устойчивость к лекарствам

BARTOŠ J. (Research Institute of Veterinary Medicine, Brno, Czechoslovakia). Comparison of the Antimicrobial Effectiveness *in vitro* of Six Drugs Recommended for the Treatment of Diarrhoea of Calves. Vet. Med. (Praha) 14 (12): 675-685, 1969.

There was compared the antimicrobial effectiveness of six drugs recommended, both in this country and abroad, for the treatment of diarrhoea of calves on *E. coli* obtained from calves (77 strains), from hares (40 strains), and from pheasants (39 strains). The *E. coli* strains obtained from calves had originated from herds that had been alternatively administered Streptonamide, Antirhoine, and Vitalin. The differences in the sensitiveness of *E. coli* strains from calves and game are most pronounced in the case of drugs that had been used for the treatment of calves. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the drugs for *E. coli* strains from calves (in brackets for strains from game) in $\mu\text{g/ml}$ were the following:

Streptonamid	3,9—128000 $\mu\text{g/ml}$ (3,9— 15,6 $\mu\text{g/ml}$)
Antirhoine	125 — 4000 $\mu\text{g/ml}$ (15,6— 125 $\mu\text{g/ml}$)
Vitalin	2000 — 16000 $\mu\text{g/ml}$ (1000 —4000 $\mu\text{g/ml}$)
Dietan	250 — 1000 $\mu\text{g/ml}$ (250 —1000 $\mu\text{g/ml}$)
Rhodovet	2000 — 8000 $\mu\text{g/ml}$ (1000 —4000 $\mu\text{g/ml}$)

Noticin applied *in vitro* did not act bacteriostatically even in a concentration of 64000 $\mu\text{g/ml}$. Urogran-Spofa in this concentration had a bacteriostatic effect on 97.4 per cent of the strains. In the case of an administration of the different therapeutic doses of Dietan, Antirhoin, Streptonamide, or Vitalin and of an intake of 1 litre of liquid, concentrations would form in the digestive organs that would inhibit the following percentage of *E. coli* coming from calves: 100 per cent in the case of Dietan, 100 per cent in the case of Antirhoin, 92.5 per cent in the case of Streptonamide, and 32.5 per cent in the case of an application of Vitalin.

calves; diarrhoea; *E. coli*; Streptonamide; Antirhoin; Vitalin; Dietan; Rhodovet; Noticin; resistance to drugs

BARTOŠ J. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Vergleich der antimikrobiellen Wirkung in vitro von sechs zur Therapie des Durchfalls bei Kälbern zu empfehlenden Medikamenten*. Vet. Med. (Praha) 14 (12): 675-685, 1969

Es wurde die antimikrobielle Wirkung von sechs bei uns und im Ausland zur Kälberdurchfall-Therapie zu empfehlenden Medikamenten auf von Kälbern (77 Stämme), Hasen (40 Stämme) und Fasanen (39 Stämme) stammenden *E. coli*-Stämmen verglichen. Die von Kälbern stammenden *E. coli*-Stämme bezogen sich auf Zuchten, wo abwechselungsweise Streptonamid, Antirhoin und Vitalin verabreicht wurden. Die Unterschiede in der Sensibilität der *E. coli*-Stämme aus Kälbern und aus Hasen und Fasanen sind am ausgeprägtesten bei den Medikamenten ersichtlich, welche zur Therapie bei Kälbern benutzt wurden. Die minimale Inhibitionskonzentration (MIC) der Medikamente für die *E. coli*-Stämme aus Kälbern (in Klammern für die Jagdwildstämme) betrugen in $\mu\text{g/ml}$:

Streptonamid	3,9—128000 $\mu\text{g/ml}$	(3,9— 15,6 $\mu\text{g/ml}$)
Antirhoin	125 — 4000 $\mu\text{g/ml}$	(15,6— 125 $\mu\text{g/ml}$)
Vitalin	2000 — 16000 $\mu\text{g/ml}$	(1000 —4000 $\mu\text{g/ml}$)
Dietan	250 — 1000 $\mu\text{g/ml}$	(250 —1000 $\mu\text{g/ml}$)
Rhodovet	2000 — 8000 $\mu\text{g/ml}$	(1000 —4000 $\mu\text{g/ml}$)

Noticin wies *in vitro* keine bakteriostatische Wirkung auch bei einer Konzentration von 64000 $\mu\text{g/ml}$ auf. Urogran wirkte bei dieser Konzentration auf 97,4 % der Stämme bakteriostatisch. Bei Verabreichung einer einmaligen Dosis von Dietan, Antirhoin, Streptonamid oder Vitalin würden sich in den Verdauungsorganen derartige Konzentrationen bilden welche folgende prozentische Mengen der aus Kälbern stammenden *E. coli*-Stämme inhibieren würden: 100 % bei Verabreichung von Dietan, 100 % bei Antirhoin, 92,3 % bei Streptonamid und 32,5 % bei Applikation des Vitalins.

Kälber; Durchfälle; *E. coli*; Streptonamid; Antirhoin; Vitalin; Dietan; Rhodovet; Noticin; Resistenz gegen Medikamente

Adresa autora:

MVDr. Jaroslav Bartoš, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno - Medlánky

DŮKAZ A STANOVENÍ REZIDUÍ EXTRAKČNÍHO BENZÍNU V KOSTNÍM TUKU PRO KRMNÉ ÚČELY PLYNOVOU CHROMATOGRAFIÍ

I. Ingr

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

INGR I. *Důkaz a stanovení reziduí extrakčního benzínu v kostním tuku pro krmné účely plynovou chromatografií.* Vet. Med. (Praha) 14 (12) : 687-693, 1969.

Při využití kostního tuku ke krmným účelům je třeba sledovat přítomnost reziduí extrakčního benzínu jako cizorodou látku. Pro tento účel byla vypracována kvalitativní a kvantitativní metoda, využívající plynové chromatografie. Předložená metoda je časově nenáročná a velmi citlivá s vyhovující přesností a re-produkovatelností pro daný účel. Bylo analyzováno 20 vzorků kostního tuku různého data výroby, u všech vzorků byla prokázána přítomnost reziduí extrakčního benzínu, jeho obsah se pohyboval v rozmezí 0,035 až 0,450 ‰, průměrná hodnota 0,154 ‰.

kostní tuk pro krmné účely; rezidua extrakčního benzínu; kvalitativní a kvantitativní analýza; plynová chromatografie; cizorodé látky

Obohacování krmných směsí pro hospodářská zvířata tuky je v zahraničí zcela běžné, aktuální se stává i u nás (Najman 1968). Po řadě různých tuků živočišného i rostlinného původu jsou nyní hledány možnosti i pro využití kostního tuku ke krmným účelům a v současné době je tato otázka řešena také z hlediska veterinárně hygienického. Podle dostupných pramenů se zkrmováním kostního tuku zabývali pouze Toullac (1966) a Dřevjany (1968), kteří zaznamenali jeho dobrou krmnou účinnost. Dosud se kostního tuku používalo z chutových a hygienických důvodů výhradně k technickým účelům — na výrobu mýdel, glycerinu, volných mastných kyselin aj. (Zajíc, Forman, Pokorný 1967). Kromě nepříjemného pachu a snížené nutriční hodnoty v důsledku pokročilých hydrolytických a oxidačních procesů je u kostního tuku možná přítomnost reziduí extrakčního benzínu, který je třeba považovat za exogenní cizorodou látku.

Kostní tuk se získává z kostí extrakcí organickými rozpouštědly, která se pak ze surového extraktu, tzv. miscely, odstraňují destilací, poslední odstranitelné zbytky destilací s vodní parou. Pokud se k extrakci používá rozpouštědel o nízkém bodu varu a úzkém rozmezí destilace, např. čistého n-hexanu, pak je jejich odstranění dokonalé. U nás se k extrakci kostního tuku používá extrakčního benzínu, který destiluje v rozmezí 80 až 100 °C.

Je to směs uhlovodíků parafinické řady, obsahující určité množství izosloučenin. Toxicita parafinických uhlovodíků je minimální a klesá s klesajícím počtem uhlíků v řetězci (Zajíc, Forman a Pokorný 1967). Vzhledem k uvedenému destilačnímu rozmezí u nás používaného extrakčního benzínu je třeba předpokládat, že nemusí být z kostního tuku zcela odstraněn. Při výrobě

se rezidua extrakčního benzínu v kostním tuku nezjišťují, jedinou kontrolou je smyslové zjišťování benzínových par ve vodním kondenzátu. I když zatím nebyly prokázány nepříznivé účinky reziduí extrakčního benzínu na zdraví a růst zvířat, popřípadě nepříznivý vliv na jakost masa z nich, bude třeba v případě využití kostního tuku ke krmným účelům tuto cizorodou látku sledovat a požadovat, aby její obsah v kostním tuku byl minimální až nulový.

V dostupné literatuře nebyla nalezena metoda zjišťování reziduí extrakčního benzínu v tucích, vyhovující našemu účelu. Tuto skutečnost lze vysvětlit tím, že surové tuky, určené k účelům potravinářským i technickým, procházejí řadou procesů, při nichž jsou zbytky extrahovadel dokonale odstraněny.

METODIKA

Smyslové zjišťování reziduí extrakčního benzínu nepřichází v úvahu pro intenzivní směsný zápach kostního tuku. Vlastními pokusy bylo zjištěno u souboru posuzovatelů, že s částečným úspěchem lze seřadit do vzestupné nebo sestupné řady modelové vzorky vepřového sádla neutrální vůně s různými přídávky extrakčního benzínu. Tentýž pokus s modelovými vzorky kostního tuku skončil s podstatně horším výsledkem.

Skutečnost, že se předpokládá velmi malý obsah reziduí a že jde o lipofilní rozpouštědlo obsažené v látce lipidního charakteru, předem vylučuje použití řady analytických metod. Hledanou látku je možno izolovat prakticky jen destilací (Šedivec a Flek 1968), což by v daném případě bylo velmi obtížné pro velmi malý obsah hledané látky.

Předložená metoda kvalitativního důkazu i kvantitativního stanovení reziduí extrakčního benzínu je založena na vypařování této látky. Rovnovážný stav soustavy kapalina — plyn je určen základními stavovými veličinami — hmotou, teplotou, tlakem a objemem nebo hustotou. Eliminací ostatních veličin se dosáhne toho, že hmota jako hledaná veličina je jedinou proměnnou. Rezidua extrakčního benzínu jsou zjišťována v parách nad vzorky kostního tuku konstantního množství, uchovávaných v konstantních vzorkovnicích při konstantní teplotě a tlaku. Kvalitativní analýza je založena na srovnání s výsledky analýz par používaného extrakčního benzínu, kvantitativní analýza na srovnání s výsledky par odebraných nad modelovými vzorky se známým obsahem extrakčního benzínu. Vlastní analytickou metodou je plynová chromatografie, která má v analýze organických rozpouštědel vynikající úspěchy pro svou vysokou citlivost, časovou nenáročnost a schopnost analyzovat složité směsi látek (Šedivec a Flek 1968).

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Do skleněných vzorkovnic o objemu 500 ml s bakelitovým uzávěrem s těsnicí vložkou z plastické hmoty se odváží 150 g kostního tuku. Výhodně lze použít i transfúzních lahví se zátkami ze silikonové gumy. Modelové vzorky se připraví odvážením 150 g vepřového sádla a přidáním známého množství extrakčního benzínu v potřebném rozsahu podle výsledků orientačních analýz. Pro dosažení homogenity a konstantního povrchu se vzorky roztaví ve vodní lázni 45 °C teplé, pomíchají se kroužením a nechají se 24 hodiny při teplotě místnosti, aby se ustálily fyzikální poměry a vytvořil se rovnovážný stav.

Z prostoru nad vzorkem se po několikerém propláchnutí injekční stříkačky odebere 1 ml par a použije se k analýze. Analýzy byly dělány na plynovém chromatografu Chrom 2 za těchto podmínek:

náplňová kolona délky 2550 mm a vnitřního průměru 6 mm;

nosič — Chromosorb W 60—100 mesh;

zakotvená fáze — polyetylglykoladipát (20 %);

teplota kolony 100 °C;

průtoky plynů: dusík 30 ml/min., vodík 30 ml/min.,

vzduch 450 ml/min.;

citlivost přístroje 1 : 200;

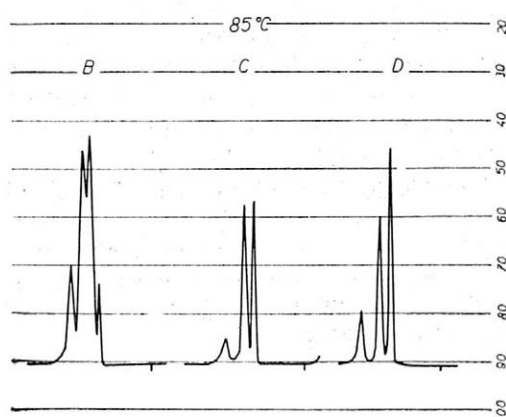
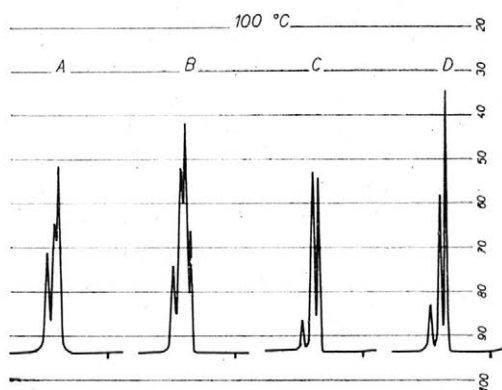
rychlost posunu papíru 10 mm/min.

Kromě polyesterů jsou vhodnými fázemi pro dělení nízemolárních alifatických uhlovodíků např. apiezony, skvalan a další (Purnell 1966).

VÝSLEDKY A DISKUSE

KVALITATIVNÍ ANALÝZA

Porovnáním elučních časů a tvarů chromatografických křivek extrakčního benzínu a par nad vzorky kostního tuku byla prokázána přítomnost reziduí extrakčního benzínu v kostním tuku (obr. 1). To bylo hlavním cílem kvalitativní analýzy. Doplňující identifikace jednotlivých složek extrakčního benzínu



1. Chromatografické záznamy při teplotě kolony 100 °C

A — rezidua extrakčního benzínu v kostním tuku;

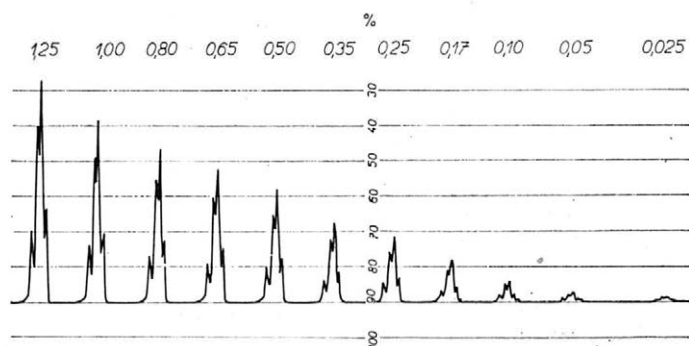
B — extrakční benzín;

C — směs n-hexanu, n-heptanu, izooktatanu a n-oktatanu;

D — směs n-hexanu, n-heptanu a n-oktatanu (maxima v uvedeném pořadí zprava; krátká silná čára pod nulovou linií vpravo je okamžik vstříku vzorku; eluční čas n-heptanu 180 vt.)

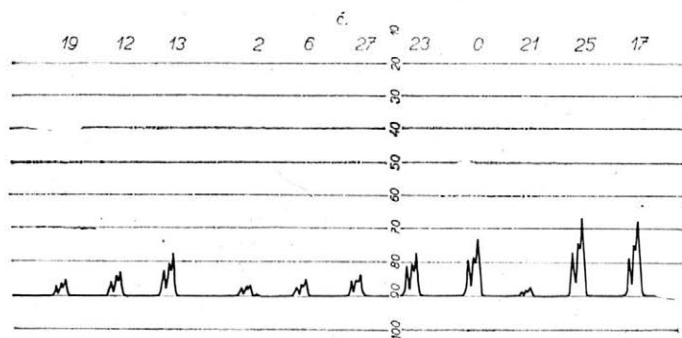
2. Chromatografické záznamy při teplotě kolony 85 °C

Označení stejné jako na obr. 1. Eluční čas n-heptanu při této teplotě 210 vt.



3. Chromatografický záznam řady modelových vzorků s uvedeným obsahem extrakčního benzínu

byla provedena metodou stejných elučních časů (Purnell 1966) pomocí dostupných standardů. Podle Zajíce, Formana a Pokorného (1967) i podle Šedivce a Fleka (1968) obsahuje extrakční benzín především n-parafiny, ale také jejich izosloučeniny — parafinické uhlovodíky s rozvětveným a cyklickým řetězcem. Udané destilační rozmezí extrakčního benzínu nasvědčuje tomu, že hlavní podíl budou tvořit uhlovodíky se šesti až osmi uhlíky v řetězci. Bylo proto k identifikaci použito směsi čistých uhlovodíků n-hexanu, n-heptanu a n-oktanu. Tři ze čtyř chromatografických maxim odpovídají svými elučními časy těmto uhlovodíkům (obr. 1). Kromě přítomnosti jednoho neidentifikovaného maxima se chromatografické záznamy extrakčního benzínu a standardů liší svým tvarem, u benzínu nedochází k úplnému rozdělení. Proto byla udělána doplňující analýza při teplotě kolony 85 °C (obr. 2) a standardní směs doplněna o izooktan, jemuž by poloha neidentifikovaného maxima mohla odpovídat. Ani při této teplotě se toto maximum nepodařilo identifikovat, poněvadž použitý standard izooktan má stejný eluční čas s n-heptanem při obou použitých teplotách (obr. 1 a 2). Správnost identifikace zbývajících tří maxim však byla potvrzena. Tvar chromatografické křivky standardů se i při této teplotě liší od křivky benzínu. Lukeš (1954) udává 17 známých a možných izosloučenin oktanu, 8 izosloučenin heptanu a 4 izosloučeniny hexanu. Podle bodů varu těchto izosloučenin lze předpokládat, že neidentifikované maximum i tvar chromatografické křivky extrakčního benzínu je způsoben přítomností většího počtu izosloučenin heptanu a oktanu. Z porovnání chromatogramů extrakčního benzínu a jeho reziduí je zřejmé, že n-hexan byl z kostního tuku zcela odstraněn (b. v. 68 °C), kdežto obsah n-oktanu relativně vzrostl (b. v. 125 °C) — obr. 1, 3, 4.



4. Chromatografické záznamy reziduí extrakčního benzínu v řadě vzorků kostního tuku

Obsah reziduí extrakčního benzínu byl stanoven metodou absolutní kalibrace (Purnell 1966). Kalibrační graf byl sestaven na základě výsledků analýz řady modelových vzorků se známým obsahem extrakčního benzínu. Základní podmínkou úspěšné kvantitativní analýzy je dodržení konstantních podmínek analýzy, především teploty vzorků, nejlépe je analyzovat modelové vzorky a vzorky kostního tuku bezprostředně za sebou. Podle výsledků orientačních analýz byla připravena řada modelových vzorků s obsahem 0,025 až 1,250 váhových procent extrakčního benzínu (obr. 3). Obsah extrakčního benzínu v modelových vzorcích i jeho reziduí v kostním tuku je vyjádřen pomocí obsahu nejvíce zastoupené a relativně nejstálější složky (b. v. 98 °C), kterou je n-heptan (obr. 3 a 4). Chromatografický záznam byl kvantitativně vyhodnocen měřením výšky maxima n-heptanu. Měření výšek je v tomto případě vhodnější než měření ploch, poněvadž maxima jsou štíhlá a eluční časy jsou velmi blízké (Šedivec a Flek 1968). Z obr. 3 je patrné, že již obsah 0,025 % je za daných podmínek zjištělný. Pouhým zvětšením vzorku lze zvýšit citlivost metody až o jeden řád. Citlivost metody je možno podstatně zvýšit také zvýšením teploty vzorků, poněvadž tenze par je funkcí teploty. Zvýšení teploty vzorků by bylo výhodné pro důkaz přítomnosti řádově nižších množství reziduí extrakčního benzínu i pro jeho kvantitativní stanovení. V daném případě je naopak výhodná konstantní teplota kolem 20 °C, poněvadž odpadá termostatování vzorků, které by celkovou dobu analýz značně prodloužilo. Vlastní plynově chromatografická analýza jednoho vzorku trvá 5 minut.

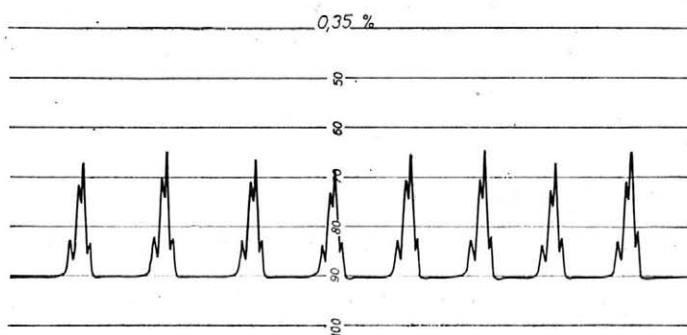
Rezidua extrakčního benzínu byla stanovena u 20 vzorků kostního tuku naší výroby, které reprezentovaly tuk vyrobený v období pěti měsíců. Byl zjištěn průměrný obsah 0,154 %, jednotlivé výsledky se pohybovaly v rozmezí 0,035 až 0,450 % (obr. 4).

Přesnost a reprodukovatelnost metody byla ověřena na modelovém vzorku s obsahem 0,350 % extrakčního benzínu osmi bezprostředně po sobě následujícími analýzami (obr. 5). Bylo dosaženo těchto výsledků:

průměrná hodnota $\bar{x}$	0,351 %
střední chyba průměru $s_{\bar{x}}$	0,008 %
směrodatná odchylka s	0,023 %
variační koeficient V (%)	6,78.

Tyto parametry je možno pokládat pro daný účel za zcela vyhovující a lze se domnívat, že při dodržení konstantní teploty vzorků budou chyby metody téměř

5. Opakované analýzy modelového vzorku s 0,35 % extrakčního benzínu pro zjištění přesnosti a reprodukovatelnosti



výhradně způsobeny subjektivní, tzv. náhodnou chybou (Eckschlager 1961) při odměřování vzorků par.

Uvedenou metodu je možno aplikovat i na jiné tuky extrahované benzínem nebo jinými organickými rozpouštědly, popřípadě na extrakční šroty.

Literatura

- DŘEVJANÝ L., 1968, Předběžná zpráva o výsledcích ověřování krmné účinnosti kostního tuku vyráběného n. p. Spolana Neratovice. Předběžná zpráva, Spofa. ECKSCHLAGER K., 1961, Chyby chemických rozborů. Praha, SNTL, 162 s.
LUKEŠ R., 1954, Organická chemie I. Praha, ČSAV, 719 s.
NAJMAN L., 1968, Problematika použití tuků do krmných směsí. Biol. a chem. výživy zvířat, 3 : 283-284.
PURNELL H., 1966, Plynová chromatografie (český překlad). Praha, SNTL, 463 s.
ŠEDIVEC V., FLEK J., 1968, Příručka analýzy organických rozpouštědel. Praha, SNTL, 386 s.
TOULLEC M., 1966, Les matières grasses dans les aliments d'allaitement pour veaux préruminant. Rev. Franc. Corps. Grass, 13 : 6, 424.
ZAJÍČ J., FORMAN L., POKORNÝ J., 1967, Technologie tuků I. Praha, SNTL, 265 s.

Došlo dne 21. 7. 1969

ИНГР И. (НИИ ветеринарии, Брно, Чехословакия). Доказательство и установление остаточных последствий экстрагированного бензина в костном жире для кормовых целей при помощи газовой хроматографии. Вет. Мед. (Прага) 14 (12) : 687-693, 1969.

При использовании костного жира для кормовых целей необходимо наблюдать за наличием остатков экстрагированного бензина как чужеродного вещества. Для этой цели разработали качественный и количественный метод с использованием газовой хроматографии. Метод непродолжительный, очень чувствительный, с удовлетворительной точностью и воспроизводимостью. Анализировали 20 образцов костного жира разной даты производства, у всех доказано наличие остатков экстрагированного бензина, содержание которого находится в пределах 0,035—0,450 %, средняя величина 0,154 %.

костный жир для кормовых целей; остатки экстрагированного бензина; количественный и качественный анализ; газовая хроматография; чужеродные вещества

INGR I. (Research Institute of Veterinary Medicine, Brno, Czechoslovakia). *Application of Gas Chromatography for the Proving and Determination of Residua of Extraction Gasoline in Bone Fat for Feeding Purposes*. Vet. Med. (Praha) 14 (12) : 687-693, 1969.

In the case of the utilization of bone fat for feeding purposes it is necessary to examine the presence of residua of extraction gasoline as a heterogenous substance. For this purpose a qualitative and quantitative method making use of gas chromatography has been worked out. The submitted method is not exigent as regards time, and it is very sensitive with a satisfactory accuracy and reproducibility for the given purpose. Analysed were 20 samples of bone fat of different dates of production. In all samples the presence of residua of extraction gasoline was ascertained, and its content ranged between 0.035 and 0.450 per cent with an average value of 0.154 per cent.

bone fat for feeding purposes; residua of extraction gasoline; qualitative and quantitative analysis; gas chromatography; heterogenous substances

INGR I. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Nachweis und Bestimmung von Extraktionsbenzin-Residuen im Knochenfett für Fütterungszwecke mit Hilfe der Gaschromatographie*. Vet. Med. (Praha) 14 (12) : 687-693, 1969.

Bei Verwendung des Knochenfetts zu Fütterungszwecken ist es nötig, das Vorkommen von Residuen des Extraktionsbenzins als fremdartigen Stoff zu verfolgen. Zu

diesem Zwecke wurde eine qualitative und quantitative Methode unter Benutzung der Chromatographie ausgearbeitet. Die vorgeschlagene Methode ist zeitsparend, sehr empfindlich, entsprechend genau und für den gegebenen Zweck reproduzierbar. Es wurden 20 Knochenfettproben verschiedenen Erzeugungsdatums analysiert. Bei allen Proben wurden Extraktionsbenzinresiduen im Ausmaß von 0,035 bis 0,450 ‰, im Durchschnitt 0,154 ‰, festgestellt.

Knochenfett zu Fütterungszwecken; Extraktionsbenzin-Residuen; qualitative und quantitative Analyse; Gaschromatographie; fremdartige Stoffe

Adresa autora:

Ing. Ivo Ingr, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno - Medlánky



TLUMENÍ STŘEČKOVITOSTI SKOTU V MONGOLSKÉ LIDOVÉ REPUBLICE

J. Minář, C. Dorž

CSAV, Parazitologický ústav, Praha

MoAV, Výzkumný ústav živočišné výroby a veterinářství, Ulan-Bator

MINÁŘ J., DORŽ C. *Tlumení střečkovitosti skotu v Mongolské lidové republice.* Vet. Med. (Praha) 14 (12) : 695-701, 1969.

Při použití československých systemických preparátů MS-1 a MS-2 proti larvám střečků metodou nanášení na povrch kůže skotu v množství průměrně 15 ml na 100 kg živé váhy hynulo po ošetření 85,2 až 99,5 % všech larev, u nedospělých larev byla zjištěna 100% účinnost. Celkové škody, působené národním hospodářství MoLR střečkovitostí skotu, byly vyčísleny na 60 milionů tugriků (14,3 mil. rublů) ročně. Uváděná nová metoda tlumení střečkovitosti preparáty MS je pro svou účinnost a jednoduchost nejvhodnější metodou v podmínkách MoLR, vhodnou k praktickému využití.

střečkovitost; tlumení; *Hypodermatidae*

Střečkovitost hovězího dobytka je v MoLR nejzávažnějším parazitárním onemocněním skotu, působícím značné ztráty národnímu hospodářství Mongolska. V roce 1968 byl proto uskutečněn intenzivní výzkum rozšíření a sezónní dynamiky podkožních střečků *Hypoderma bovis* De Geer a *H. lineatum* (De Villers) v hlavních pastevních oblastech Mongolska (Dorž, Minář 1969). S cílem vypracovat vhodné metody k tlumení střečkovitosti v podmínkách MoLR byly zkoušeny nové československé preparáty k hubení larev střečků. Byly rovněž vyčísleny škody, působené střečkovitostí skotu národnímu hospodářství MoLR.

MATERIÁL A METODIKA

Účinek preparátů na larvy střečků, usazené pod kůží na hřbetě skotu, byl sledován v jarním období (duben — květen 1968) v lesostepní zóně středního Mongolska na státním hospodářství Gacuurt a na hospodářství Vědeckovýzkumného ústavu živočišné výroby a veterinářství v Ulan-Batoru. K pokusům bylo použito nových československých preparátů MS-1 a MS-2 na základě systemicky působících organofosfátů ve zvláštních rozpustidlech (výrobce n. p. Spolana, Neratovice, ČSSR).

V prvním pokusu bylo ošetřeno a zkontrolováno 59 kusů skotu, kontrola proběhla za měsíc po ošetření. V dalším pokusu k upřesnění doby působení preparátů bylo ošetřeno 15 kusů skotu a hynutí larev bylo sledováno po 5, 8 a 10 dnech.

Preparáty byly odměřovány a pomalu vystřikovány na povrch kůže skotu na hřbetě v oblasti bederní části páteře stříkačkou typu Janet, nebo větší in-

jekční stříkačkou bez jehly v dávce 6 až 8 mg účinné látky na 1 kg živé váhy, tj. 8 až 15 ml preparátu na 100 kg. Preparáty se používají již v hotovém stavu, bez jakéhokoliv ředění.

VÝSLEDKY

POKUSY S LÉČBOU NAPADENÉHO SKOTU

Sledovali jsme působení preparátů na larvy v boulich pod kůží skotu, jejich hynutí, popřípadě výskyt dalších živých larev po ošetření. V době ošetření byly jalovice velmi silně napadeny: extenzita invaze (EI) = 100 %, průměrná intenzita invaze (II) = 23,2 larev, maximálně 83 larev na jednom zvířeti. Celkový počet larev u ošetřených jalovic dosahoval 849. U ošetřených krav v době zásahu bylo zjištěno poměrně málo larev střečků (vzhledem k opoždění vývoje larev střečků v těle dospělých krav ve srovnání s dobou vývoje u jalovic) — EI = 15,6 %, II = 2,3 larev. Při kontrole byly ze všech zjištěných boulí vybírány larvy k určení množství živých larev, přeživších léčebný zákrok.

Bylo zjištěno, že početnost boulí u skotu ošetřeného preparáty MS-1 a MS-2 se výrazně snížila ve srovnání se stavem před ošetřením a též ve srovnání s kontrolními neošetřenými kusy (tab. I). U jalovic se intenzita klinických příznaků invaze (přítomnost boulí) snížila třikrát proti stavu před ošetřením a 3,5X ve srovnání s neošetřenými kontrolními kusy.

Z celkového počtu 856 živých larev ošetřeného skotu byly při kontrole zjištěny jen čtyři živé larvy, průměrný počet živých larev na jednom zvířeti se snížil z 19,5 na 0,06. U kontrolních kusů bylo zjištěno silné napadení — u jalovic EI = 77,8 %, průměrná II = 25,0 larev, u krav bylo pozorováno další zvýšení stupně napadení — EI = 6,4 %, II = 0,7 larev, v souvislosti s rozdíly vývoje larev u jalovic dospělého skotu.

Vstřebávání boulí s mrtvými larvami III. stadia u ošetřovaného skotu probíhalo pomalu v důsledku velké pevnosti a soudržnosti kutikuly larev. Uhynulé nedospělé larvy s jemnější kutikulou (larvy II. stadia), byly postupně resorbovány; zbytky uhynulých larev III. stadia zůstávaly v kůži, z níž byly většinou místními zánětlivými procesy postupně vyloučeny. Je nutno poznamenat, že přirozená úmrtnost larev střečků pod kůží skotu je podle našich pozorování v podmínkách MoLR poměrně malá — 2,2 % sebraných larev (z celkového počtu 3117 larev): Jiní autoři uvádějí z jiných oblastí následující údaje o přirozené úmrtnosti larev v boulich: K a m a r l i (1968) — 8,8 až 23 %, S v ě š - n i k o v a (1965) — u jalovic 11,3 až 38,0 %, u dospělých krav až 59,6 %. V našem pokusu uhynulo po zásahu 99,5 % larev.

V dalším pokusu bylo preparátů MS-1 a MS-2 použito u 5 krav a 10 jalovic v dávce 8 gramů na 100 kg (tj. 14,4 ml MS-2, 10,8 ml MS-1 na 100 kg). Při kontrole po pěti dnech po ošetření bylo u krav zjištěno uhynutí všech larev (tab. II).

U silněji napadených jalovic bylo zjištěno, že během několika dní (od 5. do 10. dne) po ošetření uhynulo 85,2 až 97,4 % larev. Všechny larvy II. stadia a nedospělé larvy III. stadia uhynuly, přežily jen jednotlivé dospělé larvy (tab. II). Preparáty působí systemicky, hynou i larvy, které s nimi nepřišly do přímého styku. Účinnost u larev II. stadia byla 100 %. Podle našich výsledků je možno soudit, že larvy hynou v prvních dnech po léčebném zákroku.

Po použití zkoušených preparátů nebyly pozorovány vedlejší nepříznivé účinky na ošetřený skot jako u některých dosud používaných organofosfátů (G a l a t 1966, D o r ž 1967 aj.).

I. Srovnání stupně napadení u ošetřeného a kontrolního skotu při použití preparátů proti larvám usazeným pod kůží v jarním období 1968 v podmínkách MoLR

		Stav při ošetření										Stav při kontrole									
Skot	Věk	preparát	účinná dávka látky v g/100 kg	počet kusů	počet napadených	celkový počet boulí	maximální počet boulí	Ø počet živých larev na 1 napadeném kusu	E. I. v %	I. I. v %	počet kusů	počet napadených kusů s boulemi	počet napadených kusů s živými larvami	celkový počet boulí	maximální počet boulí	E. I. v %	I. I. v %	počet mrtvých larev	Ø počet živých larev na 1 napadeném kusu	E. E. v %	I. E. v %
Ošetření	jalovice	MS-1	6—8	11	11	274	53	29,9	100	29,9	11	8	2	65	25	72,2	8,1	63	0,18	74,4	98,9
		MS-2	6—8	26	26	575	83	22,1	100	22,1	26	15	2	63	25	57,6	4,2	61	0,07	89,1	99,5
		celkem	6—8	37	37	849	83	23,2	100	23,2	37	23	4	128	25	62,1	7,7	124	0,10	84,7	99,4
	krávy	MS-1	8	9	0	0	0	0,0	0,0	0,0	9	0	0	0	0	0,0	0,0	0	0,00	100	100
		MS-2	8	13	3	7	4	2,3	23,1	2,5	13	2	0	3	3	15,4	1,5	3	0,00	100	100
		celkem	8	22	3	7	4	0,4	13,6	0,4	22	2	0	3	3	9,0	1,5	3	0,00	100	100
		celkem	6—8	59	40	856	83	21,4	67,7	21,4	59	25	4	131	25	42,3	7,2	127	0,06	88,4	99,3
	kontrola	jalovice	—	184	176	5724	148	52,5	95,6	32,5	103	73	73	1825	96	70,8	25,0	—	17,70	—	—
		krávy	—	66	20	46	6	2,5	30,3	2,3	60	22	22	66	19	36,7	3,0	—	1,10	—	—
		celkem	—	250	196	5770	148	28,8	78,4	28,8	163	95	95	1891	96	58,3	19,9	—	11,60	—	—

II. Působení preparátů MS na larvy podkožních střečků v jarním období v podmínkách MoLR

Stáří	Látka	Počet kusů	Počet bouli	Kontrola 5 dní po ošetření	Počet larev				Kontrola 7 dní po ošetření	Počet larev				Kontrola 8 dní po ošetření	Počet larev				Kontrola 10 dní po ošetření	Počet larev			
					mrtvé		živé			mrtvé		živé			mrtvé		živé			mrtvé		živé	
					II.	III.	II.	III.		II.	III.	II.	III.		II.	III.	II.	III.		II.	III.	II.	III.
Krávy	MS-2	5	38	5	23	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MS-2	5	102	1	3	25	—	2	1	4	15	—	2	3	6	43	—	2	—	—	—	—	—
Jalovice	MS-1	5	157	1	—	7	—	—	3	12	50	—	7	—	—	—	—	—	1	8	61	—	12
Celkem	—	15	297	7	26	47	—	2	4	16	65	—	9	3	6	43	—	2	1	8	61	—	12
	—	15	297	7	73		—	2	4	81		—	9	3	49		—	2	1	69		—	12
V %	—	—	—	—	97,4		2,6			90		10			96,1		3,9			85,2		14,8	

Živočišná výroba a kožedělný průmysl jsou jedněmi z hlavních výrobních odvětví MoLR; zvláště kožedělný průmysl se silně rozvíjí. Škody působené střekovitostí jsou proto velmi závažné. Při ekonomickém hodnocení byly přesně vyčísleny škody, působené střekovitostí kožedělnému průmyslu MoLR a škody celkové.

Ekonomické ztráty, působené národním hospodářství MoLR střekovitostí skotu, byly vyčíslovány na základě údajů kožedělného průmyslu, údajů o úbytích živé váhy a doживosti napadených kusů (D o r ž 1967) a statistických údajů o stavu skotu a živočišné výrobě (1966).

Celkové škody, působené střekovitostí skotu v MoLR, se skládají ze ztrát kožedělného průmyslu, představujících 9,8 mil. tugriků, ze ztrát na výrobě mléka — 12,5 mil. tugriků a ze ztrát na živé váze dobytka — 39 mil. tugriků ročně. Celkem činí škody ročně 60 mil. tugriků (14,3 miliónů rublů). Toto číslo se při dalších výzkumech pravděpodobně ukáže ještě vyšší, uváží-li se jeho srovnání s údaji o ztrátách působených střekovitostí skotu v jiných zemích. Tak v ČSSR se tyto škody odhadují na 100 mil. Kčs (S v o b o d a 1960), v SSSR na 500 mil. rublů (B r e j e v, G r u n i n 1959).

Použití opatření k tlumení střekovitosti skotu v MoLR v širším měřítku by znamenalo značnou hospodářskou úsporu. Při 90 % účinnosti, vykázané zkoušenými československými preparáty, by jejich použití bylo ekonomicky výhodné.

DISKUSE

Účinnost opatření k tlumení střekovitosti musí podle měřítek hospodárnosti ochranných opatření podle B r e j e v a (1965) dosahovat 80 až 90 % při neškodnosti pro ošetřovaný skot a co nejnižších nárocích na pracovní dobu a stupeň nutné kvalifikace pracovníků. Pracnost metody je v podmínkách chovu skotu v MoLR zvláště závažným činitelem.

Pasivní metody ochrany skotu před napadáním střeky, jako je noční pastva, stinné úkryty a stájový odchov, jsou celkově málo účinné, nebo v podmínkách zcela pastevního chovu v MoLR nepoužitelné. Podobně téměř neuskutečnitelné jsou letní postřiky dobytka insekticidy proti naletování střeků (G a l a t 1966, K a m a r l i 1968), které je nutno opakovat každých 8 až 10 dní.

Léčebnými prostředky nejlépe postižitelné jsou larvy střeků v době parazitování v těle skotu. V současné době se používají převážně organofosfátové preparáty. Aplikují se vtíráním preparátu do otvoru v bouli (jarní ošetření), *per os*, v injekcích a u některých nových preparátů, pronikajících kůží, nanášením na povrch.

Podávání preparátů *per os* v tabletách nebo roztocích je pracné a u používaných organofosfátů (C h a t i n a kol. 1959, P o t ě m k i n 1965 aj.) vyvolává vedlejší nepříznivé účinky otravy u ošetřené dobytka při nestálé účinnosti. Preparáty podávané v injekcích (Chlorofos, Bubulin) se v řadě pokusů ukázaly jako nedostatečně účinné (J a m o v 1966, G a l a t 1966 aj.). V podmínkách MoLR se též projevila poměrně nízká účinnost této metody (12,6 až 16,5 %) za příznaků intoxikace ošetřených zvířat, nehledě na nutnost odborné kvalifikace ošetřujících (D o r ž 1967).

Vtírání preparátů do otvoru v bouli je rovněž pracné, je nutno je opakovat a nechrání od škod, působených dospělými larvami. Vhodnější je vnější nanášení preparátů se systemickým účinkem, pronikajících kůží a hubičích larvy v těle skotu. 8 až 10 % vodní roztoky chlorofosu (J a m o v 1966, D m i t r i j e v

1966) byly takto používány v dávce 200 ml na jeden kus. Příprava roztoku rozpouštěním organofosfátu v horké vodě je však pracná a množství, potřebné k ošetření, značné. Podobný preparát — Trichlormetafos-3 v 10% vodní emulzi se ukázal v pokusech v MoLR téměř neúčinný (D o r ž 1967).

Preparáty MS-1 a MS-2, zkoušené v podmínkách MoLR, splňují všechny požadavky použitelnosti určité metody v boji s hypodermatózou podle B r e j e v a (1965):

1. Účinnost těchto preparátů je podle výsledků dosavadních pokusů vysoká.
2. Spotřeba je velmi malá (průměrně 15 ml roztoku na 100 kg živé váhy).
3. Jejich použití je jednoduché, rychlé a nevyžaduje zvláštní kvalifikace pracovníků.

4. Preparátů je možno použít k podzimnímu zásahu proti larvám, migrujícím v těle skotu, i na jaře k hubení larev pod kůží.

5. Preparáty se používají přímo tak, jak jsou dodávány v hotovém stavu, aniž by bylo třeba je na místě připravovat nebo ředit.

Použití preparátů k hubení migrujících larev v podzimním a zimním období, jímž se předejde škodám, působeným vývojem larev v těle skotu, je proto výhodnější.

Pro použití preparátu (zvláště MS-2) v podmínkách MoLR je důležité, že nevyžaduje více času a práce než očkování dobytka, které je v Mongolsku běžné. Podle dosavadních výsledků lze soudit, že uvedená metoda je velmi dobře použitelná i v těchto podmínkách a její široké uplatnění v MoLR může významně přispět ke snížení ztrát působených zde podkožními střechy hovězího dobytka.

Literatura

- BREJEV K. A., 1965, Trudnosti borby s podkožnym ovodom krupnogo rogatogo skota na sovremennom etape i puti ich preodolenija. Trudy VNIIVS, XXVI: 79-87.
- BREJEV K. A., GRUNIN K. J., 1959, O rozměrech potěr koži, mjasu i moloka pričinjajenych podkožnymi ovodami krupnomu rogatomu skotu. Tez. dokl. 4-go sjezda Vsesojuzn. Entomol. obšč., I: 204-205.
- DMITRIJEV V. M., 1966, Gipodermatoz krupnogo rogatogo skota i mery borby s nim v jakutskoj ASSR. Avtoref. diss. na soisk. uč. stepeni kand. biol. nauk, Jakutsk: 1-18.
- DORŽ C., 1967, Osobennosti biologii i fenologii vozbuditelej i epizootologija gipodermatoza krupnogo rogatogo skota v MNR. Avtoref. na soisk. uč. stepeni kand. vet. nauk, Moskva: 1-15.
- DORŽ S., MINÁŘ J., 1969, Střečkovitost skotu v MoLR. Folia parasitologica, v tisku.
- GALAT V. F., 1966, Osobennosti podkožnoovodovoj invazii krupnogo rogatogo skota i sravnitel'naja effektivnost' nekotorych sredstev i metodov borby s nej v uslovijach Zapadnogo polesja USSR. Avtoref. diss. na soisk. uč. stepeni kand. vet. nauk, Vitebsk: 1-22.
- CHATIN M. G., LURJE P. Z., KOLOMIJEC J. M., SOLOVJEV V. P., 1959, Proměněnijiye chlorofosa v borbe s kožnoovodovoj invazijej krupnogo rogatogo skota. Veterinarija 3: 82-85.
- JAMOV V. Z., 1966, Razrabotka i vñedrenija sistemy meroprijatij protiv gipodermatoza v Tjumenskoj oblasti. Avtoref. diss. na soisk. uč. stepeni kand. vet. nauk, Tjumeň: 1-22.
- KAMARLI A. P., 1968, Podkožnoovodnyje bolezni krupnogo skota i koz v Kirkizii. Avtoref. diss. na soisk. uč. stepeni doktora vet. nauk, Alma-Ata: 1-30.
- POTĚMKIN V. J., 1965, Entomozы domašnich životnyh i mery borby s nimi. Avtoref. diss. na soisk. uč. stepeni doktora vet. nauk, Moskva: 1-27.
- SVĚŠNIKOVA A. F., 1965, Biologičeskije obosnovanija borby s podkožnymi ovodami krupnogo rogatogo skota v sverdlovskoj oblasti. Avtoref. diss. na soisk. uč. stepeni kand. vet. nauk, Stavropol: 1-18.

SVOBODA O., 1960, Ekonomický význam nejzávažnějších pastevních parazitůz. Ref., Symposium o prevenci parazitůz na pastvinách. Praha.
Statistika, 1966, National economy MPR. Brief collection of statistics, Ulan-Bator : 1-176.

Došlo dne 9. 1. 1969

МИНАРЖ Й., ДОРЖ Ц. (Чехословацкая академия наук, Институт паразитологии, Прага, Чехословакия). Борьба с гиподерматозом крупного рогатого скота в Монгольской Народной Республике. Вет. Мед. (Прага) 14 (12) : 695-701, 1969.

При использовании чехословацких системных препаратов MS-1 и MS-2 против личинок слепней методом нанесения на поверхности кожи крупного рогатого скота в дозе в среднем 15 мл на 100 кг живого веса после обработки погибало от 85,2 до 99,5 % всех личинок. У незрелых личинок была установлена 100% эффективность. Общий вред, причиняемый народному хозяйству Монгольской Народной Республике, был вычислен в размере 60 миллионов тугриков (14,3 млн. рублей) ежегодно. Предлагаемый новый метод борьбы с гиподерматозом препаратами MS благодаря своей эффективности и простоте является в условиях МНР самым подходящим методом, удобным для применения на практике.

гиподерматоз; защита; *Hypodermatidae*

MINAŘ J., DORŽ C. (Czechoslovak Academy of Sciences, Institute of Parasitology, Prague, Czechoslovakia). *Suppression of the Gadfly Infestation in Mongolia*. Vet. Med. (Praha) 14 (12) : 695-701, 1969.

The Czechoslovak systemic preparations MS-1 and MS-2 against gadfly larvae parasitizing on cattle, applied on the skin surface of cattle in doses of 15 ml per 100 kg of liveweight, killed after treatment 85.2 to 99.5 per cent of all larvae. Immature larvae showed a 100-percentage mortality. The total damage caused to the national economy of Mongolia by the gadfly infestation of cattle amounted to 60 mill. tugrics (14.3 mill. roubles) per year. The latest method of suppressing the gadfly infestation by the MS preparations is for its efficiency and simplicity the most proper method under the conditions of Mongolia and it may, therefore, be recommended for practical use.

gadfly infestation; suppression; *Hypodermatidae*

MINAŘ J., DORŽ C. (Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaft, Parasitologisches Institut, Praha, Tschechoslowakei). *Die Hemmung der Dasselplage beim Rind in der Mongolischen Volksrepublik*. Vet. Med. (Praha) 14 (12) : 695-701, 1969.

Bei der Benützung der tschechoslowakischen systemischen Präparaten MS-1 und MS-2 gegen Larven der Großen Rinderdasselfliege durch die Methode des Auftragens auf die Hautoberfläche des Rindes in der Menge von durchschnittlich 15 ml auf 100 kg Lebendgewicht sind 82,2 bis 99,5 % von allen Larven nach der Behandlung eingegangen; bei den unerwachsenen Larven wurde die 100% Wirksamkeit festgestellt. Die durch die Dasselplage verursachten gesamten Schäden beim Rind in der MoVR wurden auf 60 Millionen Tugrik (14,3 Mil. Rublen) jährlich numerisch ausgedrückt. Die eingeführte neue Methode der Hemmung der Dasselplage durch die MS-Präparate ist für ihre Wirksamkeit und Einfachheit die geeignetste Methode in den Bedingungen der MoVR, die für die praktische Ausnutzung zweckmäßig ist.

Dasselplage; Hemmung; *Hypodermatidae*

Adresy autorů:

RNDr. J. Minář, CSc., ČSAV, Parazitologický ústav, Praha 6, Flemingovo nám. 2, MVDr. C. Dorž, CSc., Výzkumný ústav živočišné výroby a veterinářství, MoAV, Ulan-Bator

Menšík J., Rozkošný V.: Průkaz viru IBR v souvislosti s akutním respiračním onemocněním telat a mladého skotu	653
Štěpánek J., Mesároš E., Pospíšil Z.: Izolace cytopatogenních kmenů původce virové gastroenteritidy prasat ve tkáňových kulturách	665
Bartoš J.: Porovnání antimikrobiální účinnosti <i>in vitro</i> šesti léků, doporučených k léčbě průjmů telat	675
Ingr I.: Důkaz a stanovení reziduí extrakčního benzínu v kostním tuku pro krmné účely plynovou chromatografií	687
Minář J., Dorž C.: Tlumení střečkovitosti skotu v Mongolské lidové republice	695

СОДЕРЖАНИЕ

Меншик И., Розкошны В.: Доказательство вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в связи с острым заболеванием дыхательных путей телят и молодняка крупного рогатого скота	663
Штепанек И., Месарош Э., Поспишил З.: Изоляция цитопатогенных штаммов возбудителя вирусного гастроэнтерита свиней в тканевых культурах	673
Бартош Й.: Сравнение антимикробного действия <i>in vitro</i> шести медикаментов, рекомендуемых для лечения поносов телят	684
Ингр И.: Доказательство и установление остаточных последствий экстрагированного бензина в костном жире для кормовых целей при помощи газовой хроматографии	692
Минарж Й., Дорж Ц.: Борьба с гиподерматозом крупного рогатого скота в Монгольской Народной Республике	701

CONTENT

Menšík J., Rozkošný V.: The Proving of the IBR Virus in Connection with an Acute Respiratory Disturbance of Calves and Young Cattle	664
Štěpánek J., Mesároš E., Pospíšil Z.: The Isolation of the Cytopathogenic Strains of the Originator of Virus Gastroenteritis of Pigs in Tissue Cultures	673
Bartoš J.: Comparison of the Antimicrobial Effectiveness <i>in vitro</i> of Six Drugs Recommended for the Treatment of Diarrhoea of Calves	684
Ingr I.: Application of Gas Chromatography for the Proving and Determination of Residua of Extraction Gasoline in Bone Fat for Feeding Purposes	692
Minář J., Dorž C.: Suppression of the Gadfly Infestation in Mongolia	701

INHALT

Menšík J., Rozkošný V.: Nachweis des IBR-Virus im Zusammenhang mit einer akuten respiratorischen Erkrankung von Kälbern und Jungvieh	664
Štěpánek J., Mesároš E., Pospíšil Z.: Die Isolierung von zytopathogenen Stämmen des Erregers der virusbedingten Gastroenteritis bei Schweinen in Gewebekulturen	673
Bartoš J.: Vergleich der antimikrobiellen Wirkung <i>in vitro</i> von sechs zur Therapie des Durchfalls bei Kälbern zu empfehlenden Medikamenten	685
Ingr I.: Nachweis und Bestimmung von Extraktionsbenzin-Residuen im Knochenfett für Fütterungszwecke mit Hilfe der Gaschromatographie	692
Minář J., Dorž C.: Die Hemmung der Dasselplage beim Rind in der Mongolischen Volksrepublik	701

TABLE DES MATIÈRES

Menšík J., Rozkošný V.: Preuve du virus IBR en connexité avec l'infection respiratoire aiguë des veaux et des jeunes bovins (res. An, A1/664).

Štěpánek J., Mesároš E., Pospíšil Z.: Isolement des souches cytopathogéniques de l'auteur de la gastroentérite des porcs dans les cultures de tissus (res. An, A1/673).

Bartoš J.: Comparaison de l'activité antimicrobienne *in vitro* de six médicaments recommandés au traitement des diarrhées des veaux (res. Am/684, A1/685).

Ingr I.: Preuve et dosage des résidus de la benzine d'extraction dans la graisse d'os, destinée aux buts alimentaires, par chromatographie en phase gazeuse (res. An, A1/692).

Minář J., Dorž C.: Inhibition de l'hypodermose des bovins dans la République populaire de Mongolie (res. Am, A1/701).



Rozšiřuje Poštovní novinová služba. Objednávky a předplatné přijímá PNS - ústřední expedice tisku, administrace odborného tisku, Jindřišská ul. 14, Praha 1. Lze též objednat u každé pošty i poštovního doručovatele. Objednávky do zahraničí vyřizuje PNS - ústřední expedice tisku, oddělení vývozu tisku, Jindřišská 14, Praha 1. Vytiskl MÍR, novinářské závody, n. p., závod 6, Ležerova 22, Praha 2.