

VĚDECKÝ ČASOPIS

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

9

ROČNÍK 15 (XLIII)  
PRAHA  
ZÁŘÍ 1971  
CENA 20 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ  
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

## Řídi redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král (předseda), prof. MVDr. Koloman Boďa, DrSc., doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr. Jaroslav Dražan, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., MVDr. Miloš Halaša, CSc., prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc., doc. MVDr. Jozef Hrušovský, MVDr. Jaromír Lát, MVDr. Martin Lis, CSc., MVDr. Andrej Mačička, CSc., doc. 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 1970

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

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

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

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

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

# IMUNIZÁCIA PROTI AUJESZKÉHO CHOROBE – IZOLOVANIE KLÓNU AVIRULENTNÉHO PRE KRÁLIKY A MORČATÁ A HODNOTENIE JEHO IMUNOGENITY

A. Žuffa

Bioveta, Nitra

---

ŽUFFA A. *Imunizácia proti Aujeszkeho chorobe – izolovanie klónu avirulentného pre králiky a morčatá a hodnotenie jeho imunogenity.* Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 525-538, 1971.

Pasážovanie atenuovaného kmeňa Aujeszkeho vírusu (Buk-TK-200) na kultúrach kuracích embryonálnych buniek (KEB) pri 30 °C malo za následok ďalšie oslabenie jeho virulencie. Analýzou vírusovej populácie na úrovni 100. pasáže na KEB pri 30 °C klónovaním sa zistila prevaha častíc avirulentných pre králiky. Trojnásobnou plakovou purifikáciou bol vyselektovaný klón vírusu, s označením Buk-TK-300/9,2, avirulentný pre králiky pri *i. m.*, *i. v.* a *i. perit.*, ale s reziduálnou neurovirulenciou pri *i. cer.* podaní. Virulencia klónu ostala nezmenená po 10 pasážach na KEB pri 37 °C. Králiky a morčatá, očkované odstupňovanými dávkami vírusu, obsahovali v krvnom sére neutralizačné protilátky (NP), ktorých titry boli závislé od počtu inokulácií a veľkosti vakcinačnej dávky. Dvojrázovo očkované zvieratá s vysokými titrami NP v krvnom sére odolali infekcii mnohonásobnou letálnou dávkou vírusu.

Aujeszkeho vírus; kuracie embryonálne bunky; pasážovanie pri 30 °C; klónovanie; virulencia; stabilita; imunogenita; králiky; morčatá

---

Sériové pasážovanie viacerých kmeňov Aujeszkeho vírusu (AV) na kultúrach kuracích embryonálnych buniek (KEB) (Žuffa 1963, Škoda a kol. 1964) a prasačích obličiek (Bachmann 1969) viedlo k oslabeniu ich virulencie pre ošipané, dobytok a ovce (Žuffa 1964, Žuffa a Dlhý 1964, Škoda a kol. 1964). Touto cestou se však nepodarilo oslabiť virulenciu AV do tej miery, aby stratil patogenitu pre laboratórne zvieratá, králiky a morčatá. Získanie kmeňov, avirulentných pre uvedené druhy laboratórnych zvierat, bolo žiadateľné najmä z hľadiska prípravy imúnnych sér proti AV, prostých protilátok proti vírusom napádajúcim ošipané, a použiteľných preto na diagnostické účely. Okrem toho nebolo možno použiť atenuované kmene, ktoré sú doteraz k dispozícii, vo forme živých vakcín pre účely špecifickej profylaxie Aujeszkeho choroby (Au. ch.) u kožušinových zvierat pre ich veľkú vnímavosť na experimentálnu infekciu AV, aj keď si to nákazová situácia naliehavo vyžadovala. Vírus avirulentný pre králiky získala Svobodová (1968) cestou perzistentnej infekcie kultúr telacích obličiek a Tatarov (1968) pomocou 5-jodo-desoxyuridinu. Ani jeden z uvedených autorov však neštudoval hlbšie imunologické vlastnosti svojich izolátov.

Z kmeňa Bukurešť, sériovo pasážovaného na kultúrach KEB, sme izolovali klónovaním vírusovej populácie plakovou metódou viacero línií avirulentných

pre králiky. V predkladanom oznámení referujeme o postupe, ktorý bol úspešný pri získaní avirulentných línií a o imunologických vlastnostiach jednej z nich pre laboratórne zvieratá.

## MATERIAL A METÓDY

### VÍRUSY

Vychádzali sme z 200. sériovej pasáže kmeňa Bukurešť na kultúrach KEB. Pre vyvolávajúce infekcie sme použili líniu derivovanú z tohto vírusu trojnásobnou plakovou purifikáciou a virulentný kmeň Rača v 5. pasáži na KEB. Vlastnosti použitých vírusov sme podrobne opísali v predchádzajúcich oznámeniach (Žuffa 1963, Žuffa a kol. 1968, Matis a Žuffa 1969).

### TKANIVOVÉ KULTÚRY

Pri príprave kultúr KEB v skúmavkách pre titráciu vírusu a protilátok a miskových kultúr pre izoláciu čistých línií sme postupovali rovnako ako sme opísali skôr (Žuffa a Grigelová 1966). Pri titráciách sme očkovali desaťnásobnými riedeniami vírusu po štyri skúmavkové kultúry KEB dávkou 0,1 ml a po 7dňovej inkubácii pri 37 °C sme odčítali výsledok podľa cytopatického prejavu; obsah vírusu v inokulu, vyjadrený v TKID<sub>50</sub>, sme vypočítali podľa formuly Reeda a Muencha. Pri izolácii čistých línií sme očkovali väčší počet miskových kultúr rozličnými riedeniami vírusu. Potrebný počet plakov sme odpíchli bakteriologickou kľučkou z misiek s jedným alebo niekoľko ďaleko od seba uloženými plakmi a vírus sme preniesli do skúmavkových kultúr KEB. Vyšetrovanie sér na obsah neutralizačných protilátok (NP) sme robili spôsobom bežne zaužívaným v našom laboratóriu (Škodá a Žuffa 1962).

### POKUSNÉ ZVIERATÁ

Pre pokusy sme použili troj až štvormesačné králiky vo váhe okolo 2 kg bez ohľadu na plemeno a pohlavie a morčatá vo váhe 300–400 g. Očkovali sme ich *i. m.* hlboko do stehnového svalstva. Pri infekcii sme králikom inokulovali stanovené dávky vírusu *i. m.*, morčatám sme podávali infekčný vírus *i. nas.* po 0,2 ml do každého nosného otvoru.

Krvné vzorky sme pokusným zvieratám odoberali kardiálnou punkciou pred očkovaním, revakcináciou a čelenžou a potom v stanovených časových intervaloch. Všetky séra sme inaktivovali počas 30 min pri 56 °C a až do vyšetrenia skladovali pri –20 °C. Pri vyšetrovaní sér sme dbali na to, aby sa vzorky získané od jedného zvierata brali do testu naraz.

## VÝSLEDKY

### IZOLOVANIE A VLASTNOSTI AVIRULENTNÉHO VÍRUSU

Plakovo nepurifikovaný vírus Buk-TK-200 zabíja pri parenterálnom podaní všetky králiky bez ohľadu na veľkosť inokula (Žuffa 1963). Rovnako sa chovajú aj plakové klóny izolované z tohto vírusu. Vychádzajúc z poznatkov o účinku média, multiplicity infekcie a teploty inkubácie na selekciu variantov so zníženou virulenciou, robili sme ďalšie pasážovanie tohto kmeňa na kultúrach KEB v Earlovom médiu pri teplote 30 °C, s použitím neriedenej infekčnej tekutiny ako inokula. Takýmto spôsobom prekonal kmeň Buk-TK-200 na KEB



ďalších 100 sériových pasáží. Každou 20. pasážou boli očkované po dva králiky *i. m.*, s obsahom okolo  $10^6$  TKID<sub>50</sub> vírusu v inokulu. Všetky očkované králiky uhynuli medzi čtvrtým až siedmym dňom, a v ich bedrovej mieche sa dokázal infekčný vírus v množstvách  $10^1$  až  $10^3$  TKID<sub>50</sub>/g tkaniva. Z vírusu v 100. pasáži pri 30 °C (celkom 300 pasáží na KEB) sme plakovou technikou izolovali 12 línii a každou z nich očkovali po dvoch králikoch. S výnimkou králikov očkovaných líniou č. 8 všetky ostatné pozorovaciu dobu 14 dní prežili a vytvorili nízke, ale preukazné hladiny NP (2–16). Pre potvrdenie tohto zistenia sme štyrmi z izolovaných línii (č. 1, 2, 3 a 6) očkovali po štyri králiky a štyri morčatá, ktoré prežili pozorovaciu dobu bez akýchkoľvek reakcií.

Dosiahnutý výsledok poukazuje na to, že vo vírusovej populácii boli na úrovni 100. pasáže pri 30 °C, tj. v 300. tkanivovej pasáži, v prevahe avirulentné častice, čo použitím plakovej techniky umožnilo izolovať čisté línie.

Za účelom zaistenia homogenity vírusovej populácie bola jedna z línii podrobená trojnásobnej plakovej purifikácii. Získaným klónom, s označením Buk-TK-300/9,2, sme očkovali po 10 králikov *i. m.*, *i. v.*, resp. *i. perit.* dávkou  $10^{6,3}$  TKID<sub>50</sub>. V pozorovacom čase 14 dní sa u očkovaných králikov nezistili, okrem prechodného krátkodobého zvýšenia telesnej teploty v rozpätí 40,1 °C až 40,4 °C, nijaké poruchy celkového zdravotného stavu a za 14 a 28 dní sa dokázali v krvnom sére NP v titroch 1 : 2–16 (tab. I).

I. Výsledok očkovania králikov vírusom Buk TK-300/9,2 *i. m.*, *i. v.* a *i. perit.*

| Dávka vírusu<br>v TKID <sub>50</sub> | Spôsob<br>očkovania | Výsledok<br>očkovania | Počet<br>termicky<br>reagujúcich<br>králikov | Trvanie<br>termických<br>reakcií<br>v dňoch | Obsah<br>NP v titroch<br>1 : 2–16 |
|--------------------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------|
| 10 <sup>6,3</sup>                    | <i>i. m.</i>        | 0/10*                 | 3/10                                         | 1–3                                         | 9/10                              |
|                                      | <i>i. v.</i>        | 0/10                  | 1/10                                         | 1                                           | 9/10                              |
|                                      | <i>i. perit.</i>    | 0/10                  | 1/10                                         | 1                                           | 10/10                             |

\* Čitateľ udáva počet uhynutých, resp. termicky reagujúcich, menovateľ počet očkovaných králikov

U všetkých králikov, ktoré uhynuli po *i. m.* infekcii AV, sme v bedrovej mieche dokazovali infekčný vírus v množstvách  $10^1$  až  $10^4$  TKID<sub>50</sub>/g tkaniva. Chceli sme preto zistiť, či strata virulencie jednotlivých klónov je spojená so stratou ich neuropatogenity, alebo či králiky prežívajú napriek prenikaniu a obmedzenému množeniu vírusu v CNS. Desiat králikov sme očkovali klónom Buk-TK-300/9,2 v dávke  $10^{6,6}$  TKID<sub>50</sub> *i. m.* Počnúc 3. až 12. dňa sme denne zabíjali po jednom králikovi a mozog, bedrovú a krížovú miechu vyšetrovali na prítomnosť infekčného vírusu. Všetky vyšetrenia dali negatívny výsledok.

Chýbanie vírusu v CNS u *i. m.* očkovaných králikov svedčí pre stratu neuroinvazivnosti avirulentnej varianty Buk-TK-300/9,2 pri periférnom podaní. S cieľom zistiť, čo tento vírus je schopný množiť sa v nervovom tkanive ak sa inokuluje priamo do CNS, očkovali sme *i. cer.* po dva králiky dávkami  $5 \times 10^{5,3}$  až  $5 \times 10^{1,3}$  TKID<sub>50</sub> vírusu, s rozdielom vždy jednej log<sub>10</sub> jednotky, a u uhynutých sme zisťovali prítomnosť infekčného vírusu v CNS kvantitatívne. Z výsledkov uvedených na tab. II vidieť, že klón Buk-TK-300/9,2 vykazuje reziduálnu neurovirulenciu, keďže polovica z očkovaných králikov uhynula. U uhynutých

II. Dôkaz infekčného vírusu v CNS u králikov očkovaných i. cer. vírusom Buk TK-300/9,2

| Dávka vírusu v TKID <sub>50</sub> | Číslo králikov | Výsledok očkovania     | Obsah vírusu v TKID <sub>50</sub> /g orgánu v |                |                 |
|-----------------------------------|----------------|------------------------|-----------------------------------------------|----------------|-----------------|
|                                   |                |                        | mozgu                                         | mieche hrudnej | mieche bedrovej |
| 5 × 10 <sup>0,3</sup>             | 267            | prežil                 | —                                             | —              | —               |
|                                   | 268            | prežil                 | —                                             | —              | —               |
| 5 × 10 <sup>1,3</sup>             | 269            | prežil                 | —                                             | —              | —               |
|                                   | 270            | prežil                 | —                                             | —              | —               |
| 5 × 10 <sup>2,3</sup>             | 271            | uhynul na 5. deň p. i. | 0,6*                                          | 0,5            | < 0,0           |
|                                   | 272            | uhynul na 7. deň p. i. | 1,6                                           | < 0,0          | < 0,0           |
| 5 × 10 <sup>3,3</sup>             | 273            | uhynul na 7. deň p. i. | < 0,0                                         | < 0,0          | < 0,0           |
|                                   | 274            | prežil                 | —                                             | —              | —               |
| 5 × 10 <sup>4,3</sup>             | 275            | uhynul na 5. deň p. i. | 3,5                                           | 2,0            | 1,0             |
|                                   | 276            | prežil                 | —                                             | —              | —               |
| 5 × 10 <sup>5,3</sup>             | 277            | uhynul na 5. deň p. i. | 0,5                                           | < 0,0          | < 0,0           |
|                                   | 278            | uhynul na 5. deň p. i. | N**                                           | N              | N               |

\* Neg. log<sub>10</sub>

\*\* Nerobené

zvierat sa dokázal infekčný vírus v mozgu vo všetkých prípadoch, v hrudnej mieche vo dvoch a v bedrovej v jednom prípade.

Faktorom určujúcim selekciu avirulentných variant vo vírusovej populácii v priebehu sériového pasážovania kmeňa Bukurešť na kultúrach KEB bola teplota 30 °C, pri ktorej sa pasážovanie robilo, nakoľko z rovnakého vírusu, ktorý prekonal ďalších 600 pasáží za rovnakých podmienok, ale pri 37 °C, sa plakovou technikou nepodarilo izolovať klóny avirulentné pre králiky (Ž u f f a a Ž u f f o v á 1966). Bolo preto zaujímavé zistiť, či spätné pasážovanie vírusovej varianty pri 37 °C nepovedie k zvýšeniu virulencie vírusu. Klón č. 300/9,2 sme pasážovali pri 37 °C a 5. a 10. pasážou očkovali po 8 králikov i. m. Všetky králiky pozorovaciu dobu prežili, čo poukazuje na to, že v priebehu 10 pasáží pri 37 °C si zachoval nezmenenú virulenciu.

#### IMUNOGENITA VÍRUSU Buk-TK-300/9,2 PRE LABORATÓRNE ZVIERATÁ

##### Imunogenita pre králiky

a) Imunitná odpoveď po dvojrázovom podaní veľkej dávky vírusu

Králikom, v počte 28 zvierat, sme inokulovali okolo 10<sup>7,0</sup> TKID<sub>50</sub> vírusu dvojrázove v intervale štyroch týždňov. Imunita vakcinovaných zvierat bola testo-

vaná za ďalšie dva týždne inokuláciou odstupňovaných dávok kmeňa Buk-TK-200 resp. virulentného kmeňa Rača-TK-5; súčasne boli hraničnými dávkami vírusu infikované kontrolne neimunizované králiky. Výsledky protilátkovej odpovedi sú znázornené na obr. 1, výsledky infekcie zhrnuté na tab. III. Jednorázové očkovanie vyvolalo tvorbu nízkych, ale preukazných hladín NP a revakcinácia viedla k vzostupu protilátok do vysokých titrov (1:16—512). Infekciu prežili všetky králiky, ktoré dostali kmeň Buk-TK-200 bez ohľadu na veľkosť inokula; pri infekcii kmeňom Rača-TK-5 bola kritická dávka  $10^{4.5}$  TKID<sub>50</sub>, pri ktorej prežil jeden z dvoch králikov, kým všetky infikované väčšou dávkou uhynuli a menšou prežili. U zvierat, ktoré prežili infekciu, ostali protilátky na rovnakej úrovni, alebo došlo k ich poklesu.

b) Imunitná odpoveď po dvojrázovom podaní odstupňovaných dávok vírusu

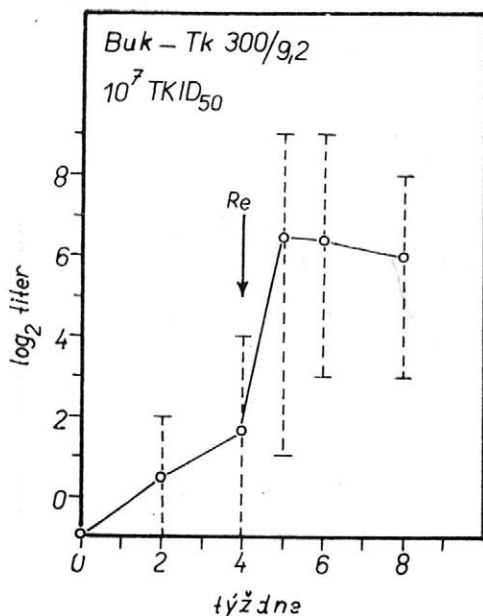
Vychádzajúc z vyššie uvedených výsledkov, chceli sme v ďalšom pokuse na králikoch zistiť, aké množstvo vírusu je potrebné na vyvolanie merateľnej protilátkovej odpovedi a aký je vzťah medzi obsahom NP v krvnom sére a odolnosťou proti infekcii. Za tým účelom sme očkovali odstupňovanými dávkami vírusu skupiny po piatich králikoch dvojrázovo. Za 14 dní po revakcinácii sme všetky králiky infikovali neriedeným vírusom Buk-TK-200 *i. m.* Z výsledkov znázornených na obr. 2 vidieť, že po jednorázovom očkovaní sa zistili rovnaké hodnoty NP vo všetkých skupinách bez ohľadu na veľkosť inokula, zatiaľ čo po revakcinácii bol vzostup protilátok v priamom vzťahu k obsahu vírusu v bistrovej dávke; čelenž dávkou  $10^{7.0}$  TKID<sub>50</sub> prežili štyri z piatich králikov očkovaných neriedeným vírusom a dva z králikov očkovaných dávkou  $10^{5.5}$  TKID<sub>50</sub>, kým všetky ostatné uhynuli (tab. IV). Okrem potvrdenia predchádzajúcich výsledkov sa v tomto pokuse zistilo, že aj malé dávky avirulentného vírusu podané králikom jednorázovo vyvolajú tvorbu protilátok v preukazných titroch, pričom však ani dvojnásobné podanie riedeného vírusu, doprevádzané tvorbou NP v titroch 1:4—32, neznamena chránenosť proti masívnej vyvolávajúcej infekcii.

### Imunogenita pre morčatá

a) Imunitná odpoveď po dvojrázovom podaní veľkej dávky vírusu

Po stanovení reaktivity králikov na očkovanie avirulentnou variantou Buk-TK-300/9,2 chceli sme zistiť, ako odpovedajú na podanie tohto vírusu morčatá, a to jak v produkcii protilátok, tak aj v chránenosti proti čelenži.

Dvadsaťštyri morčiat sme očkovali dávkou okolo  $10^{7.0}$  TKID<sub>50</sub> dvojrázovo, v intervale štyroch týždňov. Za štyri týždne nato sme ich infikovali odstupňovanými dávkami vírusu Buk-TK-200, v skupinách po šiestich zvieratách pre každú



1. Hladiny NP u králikov po dvojrázovom očkovaní veľkou dávkou vírusu Buk-TK-300/9,2 a infekcii virulentným vírusom

III. Výsledok infekcie králikov očkovaných dvojrázovo vírusom Buk TK-300/9,2 s použitím veľkého inokula

| Vírus použitý k infekcii | Králiky          | Infekčná dávka v TKID <sub>50</sub> | Číslo králikov | Výsledok infekcie      | Titry VN-proti-látok |                       |
|--------------------------|------------------|-------------------------------------|----------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
|                          |                  |                                     |                |                        | v čase infekcie      | za 14 dní po infekcii |
| Rača-TK-5                | vakcino-<br>vané | 6,5*                                | 471            | uhynul na 4. deň p. i. | 128                  | —                     |
|                          |                  |                                     | 474            | uhynul na 4. deň p. i. | 32                   | —                     |
|                          |                  | 5,5                                 | 470            | uhynul na 5. deň p. i. | 64                   | —                     |
|                          |                  |                                     | 475            | uhynul na 4. deň p. i. | 32                   | —                     |
|                          |                  | 4,5                                 | 468            | prežil                 | 256                  | 128                   |
|                          |                  |                                     | 469            | uhynul na 4. deň p. i. | 32                   | —                     |
|                          |                  | 3,5                                 | 464            | prežil                 | 64                   | 32                    |
|                          |                  |                                     | 467            | prežil                 | 512                  | 64                    |
|                          |                  | 2,5                                 | 2765           | prežil                 | 16                   | 16                    |
|                          |                  |                                     | 2764           | prežil                 | 32                   | 32                    |
|                          | kontroly         | 1,5                                 | 3582           | uhynul na 4. deň p. i. | —                    | —                     |
|                          |                  |                                     | 3583           | uhynul na 5. deň p. i. | —                    | —                     |
|                          |                  | 0,5                                 | 1496           | uhynul na 5. deň p. i. | —                    | —                     |
|                          |                  |                                     | 1497           | uhynul na 4. deň p. i. | —                    | —                     |
| Buk-TK-200               | vakcino-<br>vané | 7,6                                 | 463            | prežil                 | 256                  | 256                   |
|                          |                  |                                     | 2773           | prežil                 | 256                  | 128                   |
|                          |                  | 6,6                                 | 465            | prežil                 | 512                  | 128                   |
|                          |                  |                                     | 466            | prežil                 | 256                  | 256                   |
|                          |                  | 5,6                                 | 2782           | prežil                 | 128                  | 128                   |
|                          |                  |                                     | 2770           | prežil                 | 128                  | 128                   |
|                          |                  | 4,6                                 | 2769           | prežil                 | 512                  | 128                   |
|                          |                  |                                     | 2776           | prežil                 | 256                  | 256                   |
|                          |                  | 3,6                                 | 2773           | prežil                 | 512                  | 64                    |
|                          |                  |                                     | 2780           | prežil                 | 128                  | 128                   |
|                          |                  | 2,6                                 | 2766           | prežil                 | 16                   | 16                    |
|                          |                  |                                     | 2767           | prežil                 | 128                  | 128                   |
| Kontroly                 |                  | 2,6                                 | 1490           | uhynul na 4. deň p. i. | —                    | —                     |
|                          |                  |                                     | 1491           | uhynul na 4. deň p. i. | —                    | —                     |
|                          |                  | 1,6                                 | 1492           | uhynul na 5. deň p. i. | —                    | —                     |
|                          |                  |                                     | 1493           | uhynul na 5. deň p. i. | —                    | —                     |

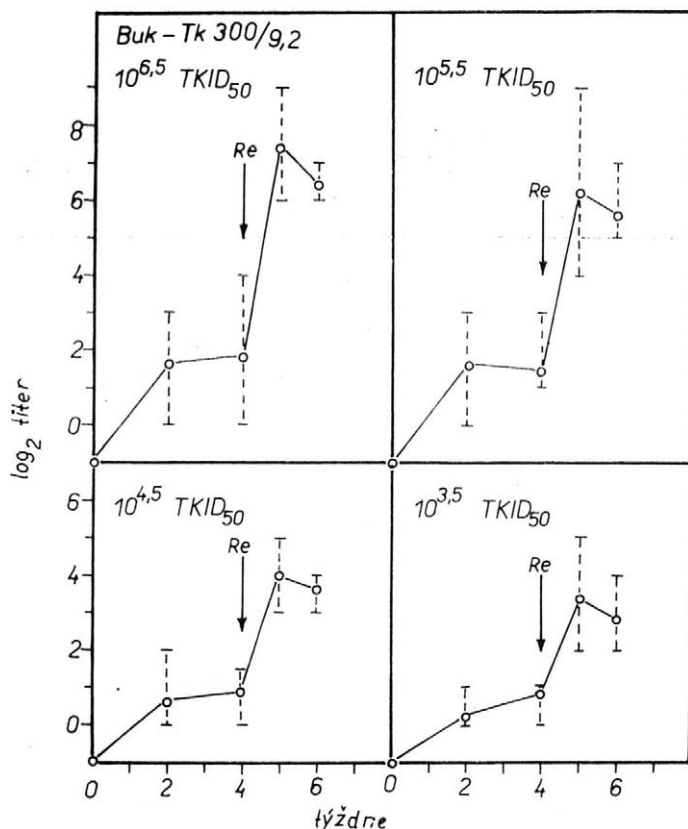
\* neg. log<sub>10</sub>

IV. Výsledok infekcie králikov očkovaných dvojrázovo odstupňovanými dávkami vírusu Buk TK-300/9,2

| Králiky     | Infekčná dávka<br>v TKID <sub>50</sub> | Vakcinačná dávka<br>v TKID <sub>50</sub> | Číslo<br>králikov | Titre NP<br>v čase<br>infekcie | Výsledok infekcie              |
|-------------|----------------------------------------|------------------------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Vakcinované | 10 <sup>7,0</sup>                      | 10 <sup>6,5</sup>                        | 335               | 64                             | prežil                         |
|             |                                        |                                          | 334               | 512                            | prežil                         |
|             |                                        |                                          | 334               | 128                            | prežil                         |
|             |                                        |                                          | 332               | 512                            | prežil                         |
|             |                                        |                                          | 331               | 64                             | uhynul na 8. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        | 10 <sup>5,5</sup>                        | 340               | 16                             | uhynul na 7. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        |                                          | 339               | 32                             | uhynul na 11. deň <i>p. i.</i> |
|             |                                        |                                          | 338               | 128                            | uhynul na 8. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        |                                          | 337               | 512                            | prežil                         |
|             |                                        |                                          | 336               | 64                             | prežil                         |
|             |                                        | 10 <sup>4,5</sup>                        | 345               | 8                              | uhynul na 7. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        |                                          | 344               | 16                             | uhynul na 12. deň <i>p. i.</i> |
|             |                                        |                                          | 343               | 16                             | uhynul na 12. deň <i>p. i.</i> |
|             |                                        |                                          | 342               | 32                             | uhynul na 7. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        |                                          | 341               | 16                             | uhynul na 8. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        | 10 <sup>3,5</sup>                        | 350               | 32                             | uhynul na 8. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        |                                          | 349               | 8                              | uhynul na 7. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        |                                          | 348               | 4                              | uhynul na 6. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        |                                          | 347               | 8                              | uhynul na 7. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        |                                          | 346               | 16                             | uhynul na 7. deň <i>p. i.</i>  |
| Kontroly    | 10 <sup>2,0</sup>                      | —                                        | 316               | —                              | uhynul na 5. deň <i>p. i.</i>  |
|             | 10 <sup>1,0</sup>                      |                                          | 317               | —                              | uhynul na 5. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        |                                          | 315               | —                              | uhynul na 6. deň <i>p. i.</i>  |
|             |                                        |                                          | 314               | —                              | uhynul na 8. deň <i>p. i.</i>  |



2. Hladiny NP u králíků po dvojrázovém očkování odstupňovanými dávkami virusu Buk-TK-300/9,2



V. Výsledek infekcie morčiat očkovaných dvojrázovo vírusom Buk TK-300/9,2 s použitím veľkého inokula

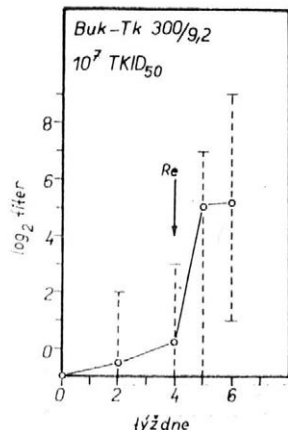
| Morčatá     | Infekčná dávka v $\text{TKID}_{50}$ | Počet morčiat | Výsledek infekcie |         |
|-------------|-------------------------------------|---------------|-------------------|---------|
|             |                                     |               | uhynulo           | prežilo |
| Vakcinované | $10^{7,5}$                          | 6             | 3                 | 3       |
|             | $10^{6,5}$                          | 6             | 1                 | 5       |
|             | $10^{5,5}$                          | 6             | 1                 | 5       |
|             | $10^{4,5}$                          | 6             | 0                 | 6       |
| Kontroly    | $10^{6,5}$                          | 4             | 4                 | 0       |
|             | $10^{5,5}$                          | 4             | 4                 | 0       |
|             | $10^{4,5}$                          | 4             | 2                 | 2       |
|             | $10^{3,5}$                          | 4             | 0                 | 4       |

dávku. Súčasne sa robila kontrolná titrácia infekčného vírusu na nevakcinovaných morčatách. Dosiahnuté výsledky sú zhrnuté na obr. 3 a tab. V. Na rozdiel od sérologických nálezov u králikov sa nezistili takmer u polovice morčiat preukazné hladiny NP po jednorázovom podaní veľkej dávky vírusu. Revakcinácia viedla k signifikantnému vzostupu protilátok u všetkých zvierat, jednotlivé hodnoty sú však veľmi rozdielne a v priemere preukazne nižšie ako u králikov. Infekciu podľahla polovica z morčiat členených dávkou  $10^{7,5}$  TKID<sub>50</sub>, čo predstavovalo  $10^3$  LD<sub>50</sub>, ako ukázala kontrolná titrácia na morčatách, a po jednom zo skupín infikovaných riedeným vírusom.

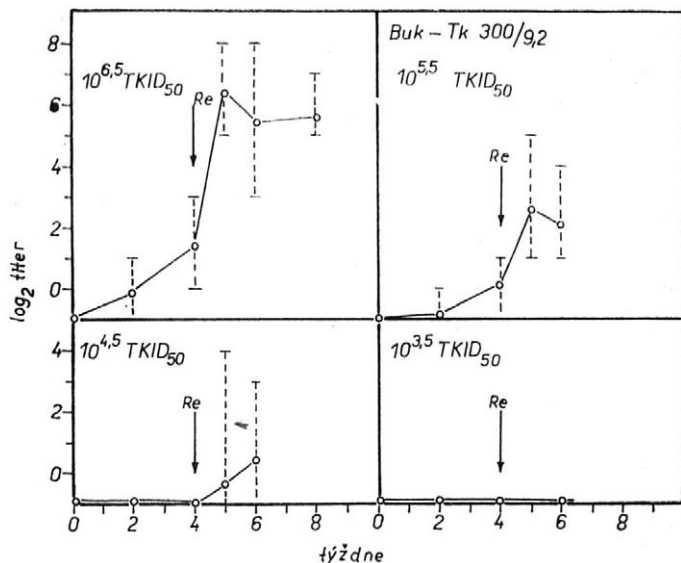
b) Imunitná odpoveď po dvojrázovom podaní odstupňovaných dávok vírusu

V ďalšom pokuse sme skupinám po 10 morčiat inokulovali odstupňované množstvá vírusu dvojrázove, v intervale štyroch týždňov. Imunita všetkých zvierat bola testovaná za ďalšie dva týždne *i. nas.* podaním neriedeného vírusu Buk-TK-200, s kontrolnou infekciou neočkovaných morčiat. Merateľné hodnoty protilátok po jednorázovom podaní a ich vzostup do vysokých titrov po revakcinácii sa dokázali len u morčiat očkovaných dávkou  $10^{6,5}$  TKID<sub>50</sub> vírusu, kým pri použití inokula s obsahom vírusu  $10^{5,5}$  TKID<sub>50</sub> sa zistili NP v nízkych titroch až po revakcinácii a zvieratá ostatných skupín ostali prakticky bez protilátok (obr. 4). Chránenosť proti infekcii bola v priamom vzťahu k úrovni protilátok, keď prežili len zvieratá očkované neriedeným inokulom a s vysokým obsahom NP, zatiaľ čo v ostatných skupinách uhynuli všetky alebo najväčšia časť morčiat (tab. VI).

Výsledky týchto vyšetrení svedčia pre to, že morčatá, ktoré sú pomerne rezistentné na experimentálnu infekciu AV, vytvárajú po očkovaní avirulentným vírusom preukazne nižšie hladiny protilátok a vykazujú nižší stupeň chránenosti ako veľmi vnímavé králiky.



3. Hladiny NP u morčiat po dvojrázovom očkovaní veľkou dávkou vírusu Buk-TK-300/9,2



4. Hladiny NP u morčiat po dvojrázovom očkovaní odstupňovanými dávkami vírusu Buk-TK-300/9,2

| Morčatá     | Infekčná dávka<br>v TKID <sub>50</sub> | Vakcinačná dávka<br>v TKID <sub>50</sub> | Počet morčiat | Výsledok infekcie |         |
|-------------|----------------------------------------|------------------------------------------|---------------|-------------------|---------|
|             |                                        |                                          |               | uhynulo           | prežilo |
| Vakcinované | $2 \times 10^{5,7}$                    | $10^{0,5}$                               | 10            | 1                 | 9       |
|             |                                        | $10^{5,5}$                               | 10            | 7                 | 3       |
|             |                                        | $10^{4,5}$                               | 10            | 10                | 0       |
|             |                                        | $10^{3,5}$                               | 10            | 10                | 0       |
| Kontrolné   | $2 \times 10^{5,7}$                    | —                                        | 4             | 4                 | 0       |
|             | $2 \times 10^{4,7}$                    |                                          | 4             | 3                 | 1       |
|             | $2 \times 10^{3,7}$                    |                                          | 4             | 1                 | 3       |

## DISKUSIA

Hlavným cieľom predkladanej práce bolo izolovať klón vírusu Au. ch., atenuovaný do tej miery, aby stratil patogenitu pre laboratórne zvieratá. Pre naše pokusy sme použili kmeň Buk-TK-200, ktorý po prekonaní 200 pasáží na kultúrach KEB stratil virulenciu pre ošípané (Žuffa 1963, 1964). Ďalšie pasážovanie tohto kmeňa na rovnakom druhu tkaniva viedlo síce k strate jeho virulencie pre dobytok a ovce (Žuffa a Dlhý 1964, Žuffa 1966), ale ani selekciou maloplakových klónov z populácie na úrovni 621. pasáže (Škoda a Jamrichová 1965), resp. klónov vykazujúcich zníženú virulenciu pre králiky na úrovni 900. tkanivovej pasáže (Žuffa a Salaj 1971) sa nepodarilo izolovať vírus avirulentný pre králiky.

Keď uvedené pokusy nepriniesli očakávaný výsledok, aplikovali sme v ďalšom poznatky o zmenách virulencie vírusov, ku ktorým dochádza v priebehu ich kultivácie pri nízkych teplotách (Dubes a Wenner 1957, Lwoff a Lwoff 1960, Sabin 1960 a ďalší) a kmeň Buk-TK-200 pasážovali pri 30 °C. Ako ukázala plaková analýza, boli vo vírusovej populácii na úrovni 100. pasáže pri 30 °C v prevahe avirulentné vírusové častice, i keď neklónovaný vírus bol pre králiky virulentný. Svobodová (1968) získala naproti tomu cestou perzistentnej infekcie primárnych kultúr telacích obličiek kmeňom BUK, inkubovaných pri 37 °C, homogénnu maloplakovú avirulentnú populáciu AV, keďže králiky prežívali očkovanie plakovo nepurifikovaným vírusom. Z uvedených výsledkov možno usudzovať, že telacie obličkové bunky disponujú, za podmienok perzistentnej infekcie, vyššou schopnosťou selektovať z heterogénnej populácie AV avirulentné varianty (mutanty) ako kultúry KEB pri bežnom spôsobe infekcie.

Avirulentný klón Buk-TK-300/9,2 vykazuje — v porovnaní s menej atenuovanými alebo virulentnými kmeňmi AV — rozdiely v cytopatogenite (Žuffa a Grigelová 1966) a lokalizácii fluoreskujúceho antigénu (Žuffa a kol. 1968) na prasačích, resp. telacích obličkových bunkách, elektroforetickej mobi-

lite (Matis a Žuffa 1969) a termostabilita (Žuffa a Matis 1970). Majúc za to, že všetky tieto vlastnosti AV majú spoločný základ v štrukturálnych zmenách vírusového proteínu, možno prijať názor, že aj zmeny vo virulencii vírusu sú determinované zmenami proteinového obalu.

Prihliadajúc k vysokej vnímavosti králikov na experimentálnu infekciu AV, keď jedna PFU kmeňa BUK na úrovni 625. pasáže (Svobodová 1968), resp. 1000. pasáže na kultúrach KEB (Škoda a Jamrichová 1965) predstavovala 1 LD<sub>50</sub> pre králiky, svedčí prežívanie králikov po inokulácii neriedeného vírusu o absencii virulentných častíc vo vírusovej populácii. Virulencia vírusu Buk-TK-300/9,2 sa nezmenila ani po 10 pasážach na KEB pri 37 °C. Možno preto oprávnenne predpokladať, že dodržaním kultivačných podmienok, ktoré viedli k získaniu populácie s prevahou avirulentných častíc, sa udrží virulencia klónovaného vírusu na rovnakej úrovni.

U králikov infikovaných virulentnými kmeňmi AV sa dokazuje vírus vždy v bedrovej mieche v množstvách až do 10<sup>4</sup> TKID<sub>50</sub>/g tkaniva (Ercegovac 1959). Keďže AV sa z miesta primárneho množenia dostáva do CNS pravdepodobne pozdĺž periférnych nervov (Bergmann a Becker 1967, Sabó a kol. 1968, Rajčani a kol. 1969), svedčí chýbanie infekčného vírusu v bedrovej mieche u králikov očkovaných vírusom Buk-TK-300/9,2 pre jeho neschopnosť zachytiť sa na vláknoch inervujúcich miesto inokulácie a preniknúť do CNS pri *i. m.*, resp. prestúpiť hemato-encefalickú bariéru pri *i. v.* podaní.

Pri hodnotení antigénnej potencie vírusu Buk-TK-300/9,2 sa zistilo, že králiky reagujú tvorbou merateľných hladín NP po jednorázovom podaní malých dávok vírusu, kým morčatá vytvárajú NP len po podaní veľkého inokula. Pri prvom očkovaní sa vystačí pre navodenie stavu imunologického preladenia, charakterizovaného pripravenosťou imunokompetentných buniek k pohotovej tvorbe protilátok, s malou dávkou vírusu, kým pri revakcinácii sa na vyvolanie vzostupu protilátok do vysokých titrov vyžaduje veľké inokulum. Králiky sa ukázali ako lepší producenti protilátok proti AV ako morčatá. Obsah NP vo vybraných vzorkách králičích sér dovoľuje použiť ich pre rozličné diagnostické ciele, vrátane prípravy špecifických konjugátov.

Odolnosť vakcinovaných zvierat proti čelenži bola závislá od veľkosti inokula, ktoré určovalo obsah protilátok v krvnom sére, i od vírusu použitého k čelenži. Kým králiky s rovnakým obsahom protilátok prežili 10<sup>6,6</sup> LD<sub>50</sub> vírusu Buk-TK-200, pri infekcii kmeňom Rača-TK-5 prežili len 10<sup>3,0</sup> LD<sub>50</sub>. Zaznamenané rozdiely môžu byť zapríčinené rozdielnou schopnosťou virionov obidvoch kmeňov zachytiť sa na zakončeníach periférnych nervov a migrovať pozdĺž nervových vlákien do CNS, alebo rozdielmi v citlivosti na účinok špecifických protilátok.

Úroveň protilátkovej odpovedi i stupeň chránenosti proti čelenži, aký sme zaznamenali po očkovaní králikov i morčiat klónom Buk-TK-300/9,2, sa nedosiahol očkovaním vírusom inaktivovaným chemickou alebo fyzikálnou cestou (Beládi a Ivánovics 1954, Ivaničová a kol. 1963, Žuffa 1963, Žuffa a Matis 1970). Strata virulencie pri zachovaní antigenity vírusu dáva preto možnosť použiť ho pre prípravu živej vakcíny určenej na imunizáciu najvýmavnejších druhov hospodárskych zvierat.

## Literatúra

BACHMANN P. A., 1969, Attenuiertes Pseudorabies-Virus und seine Verwendung als Lebendimpfstoff. Internat. Pig Vet. Soc. Proc. of the 1th Congress, Cambridge 23.-28. 6. 1969.

- BÉLADI I. O., IVÁNOVICS G., 1954, Laboratoriumi állatok immunizálása ultraibolyafénnyel inaktívált Aujeszky-féle vírussal. Magy. Állatorv. L. 9 : 255-259.
- BERGMANN V., BECKER C. H., 1967, Untersuchungen zur Pathomorphologie und Pathogenese der Aujeszky'schen Krankheit. Path. vet. 4 : 97-119.
- DUBES G. R., WENNER H. A., 1957, Virulence of polioviruses in relation to variant characteristics distinguishable on cells in vitro. Virology 4 : 275-296.
- ERCEGOVAC D., 1959, Prilog poznavanju tropizma virusa Aujeskijeve bolesti u organizmu veštački inficiranih kunita. Beitrag zur Kenntnis des Tropismus des Virus Morbus Aujeszky im Organismus der künstlich infizierten Kaninchen. Acta veterinaria (Beograd) 9 : 3-8.
- IVANIČOVÁ Š., ŠKODA R., MAYER V., SOKOL F., 1963, Inactivation of Aujeszky disease (Pseudorabies) virus by nitrous acid. Acta virol. 7 : 7-15.
- LWOFF A., LWOFF M., 1960, Sur les facteurs du développement viral et leur rôle dans l'évolution de l'infection. Annal. de l'Institut Pasteur 98 : 173-203.
- MATIS J., ŽUFFA A., 1969, Zonal electrophoresis of pseudorabies virus in sucrose density gradient. Acta virol. 13 : 371-378.
- RAJČÁNI J., SABÓ A., BLÁŠKOVIČ D., 1969, Studies on the pathogenesis of Aujeszky's disease. II. The distribution of virus after subcutaneous infection. Acta virol. 13 : 52- .
- SABIN A. B., 1960, Behaviour of cold mutants of poliovirus in human beings. Sec. internat. Conference of Live Poliovirus Vaccines, Sc. Publ. No 50 : 10-108.
- SABO A., RAJČÁNI J., BLÁŠKOVIČ D., 1968, Studies on the pathogenesis of Aujeszky's disease. I. Distribution of the virulent virus in piglets after peroral infection. Acta virol. 12 : 214-221.
- SVOVODOVÁ-SOMOGYIOVÁ J., 1968, Pseudorabies virus with lost virulence for rabbits after intramuscular inoculation, obtained from persistently infected cell cultures. Acta virol. 12 : 285.
- ŠKODA R., ŽUFFA A., 1962, Die Diagnostik der Aujeszky'schen Krankheit auf Gewebekulturen. Arch. exp. Veterinärmed. 16 : 491-500.
- ŠKODA R., BRAUNER I., ŠÁDECKÝ E., MAYER V., 1964, Immunization against Aujeszky's disease with live vaccine. I. Attenuation of virus and some properties of attenuated strains. Acta virol. 8 : 1-9.
- ŠKODA R., JAMRICHOVÁ O., 1965, Small plaque variants of pseudorabies virus in chick embryo cell cultures. Acta virol. 9 : 94.
- TATAROV G., 1968, Apathogener Mutant des Aujeszky-Virus, induziert von 5-Jodo-2-Deoxyuridin (JUDR). Zbl. Veterinärmed., B, 15 : 847-853.
- ŽUFFA A., 1963, Versuch zur Immunisierung von Laboratoriumstieren und Schweinen mittels Formaldehyd- und UV-Strahlen inaktiviertem Aujeszky-Virus. Arch. exp. Veterinärmed. 17 : 593-613.
- ŽUFFA A., 1964, Immunisierung gegen die Aujeszky'sche Krankheit. IV. Einige immunologische Eigenschaften des modifizierten Virus der Aujeszky'schen Krankheit. Arch. exp. Veterinärmed. 18 : 1099-1117.
- ŽUFFA A., DLHÝ V., 1964, Immunisierung gegen die Aujeszky'sche Krankheit. VI. Vakzinierung von Rindern mit dem modifizierten Virus der Aujeszky'schen Krankheit. Monatshefte f. Veterinärmed. 19 : 801-803.
- ŽUFFA A., 1966, Immunization against Aujeszky's disease. VII. The use of further modified virus for preventive vaccination of sheep. Zentralblatt Bakt. 1: Orig. 201 : 423-431.
- ŽUFFA A., GRÍGELOVÁ K., 1966, Immunisierung gegen die Aujeszky'sche Krankheit. II. Studium der Zytopathogenität und Plaque-Morphologie verschiedener Virusstämme in Beziehung zu ihrer Virulenz für Schweine. Arch. exp. Veterinärmed. 20 : 127-140.
- ŽUFFA A., MATIS J., PLEVA V., 1963, Studies on several strains of pseudorabies (Aujeszky) virus showing different virulence by means of the immuno- and acridine orange fluorescence. Arch. ges. Virusforsch. 24 : 396-405.
- ŽUFFA A., MATIS J., 1970, The loss of antigenicity of Aujeszky's (Pseudorabies) virus inactivated by heating in the presence of MgCl<sub>2</sub>. Vet. Čas. 13 : 101-109.
- ŽUFFA A., SALAJ J., 1971, Imunizácia proti Aujeszkého chorobe - imunogenita vysoko atenuovaného kmeňa Buk-TK-900/IV, a pre ošípané. Vet. Med. (Praha) 4 : 221-233.

Došlo dne 16. 11. 1970

ЖУФФА А. (Бновета, Нитра, Чехословакия). Иммунизация от болезни Ауески — изолирование авирулентного клона для кроликов и морских свинок и оценка его иммуногенности. *Vet. Med. (Praha)* 16 (9) : 525-538, 1971.

Пассирование атenuированного штамма вируса Ауески (Buk-TK-200) на культурах куриных эмбриональных клеток (КЭК) при 30 °C вызывало дальнейшее ослабление его вирулентности. При помощи анализа вирусной популяции на уровне 100 пассажа на КЭК при 30 °C клонированием было установлено преобладающее большинство частиц, авирулентных для кроликов. Трехкратной плаковой очисткой отселектированный клон вируса с обозначением Buk-TK-300/9,2 был авирулентен для кроликов при *i. m.*, *i. v.* и *i. perit.*, однако с остаточной невровирулентностью при *i. cer.* подаче. Вирулентность клона осталась без изменения после 10 пассажей на КЭК при 37 °C. Кролики и морские свинки, вакцинированные дифференцированными дозами вируса, содержали в сыворотке крови нейтральные антитела (НА), титры которых зависели от числа инокуляции и размера дозы вакцинации. Двукратно вакцинированные животные с высокими титрами НА в сыворотке крови были устойчивыми к инфекции многократной смертельной дозой вируса.

вирус Ауески; куриные эмбриональные клетки; пассирование при 30 °C; клонирование; вирулентность; стабильность; иммуногенность; кролики; морские свинки

ŽUFFA A. (Bioveta, Nitra, Czechoslovakia). *Immunization against Aujeszky's Disease — Isolation of the Clone Avirulent for Rabbits and Guinea-Pigs and the Evaluation of its Immunogenicity.* *Vet. Med. (Praha)* 16 (9) : 525-538, 1971.

The passage of the attenuated strain of Aujeszky's virus (Buk-TK-200) on chick-embryo cells (CEC) at 30 °C resulted in an additional weakening of its virulence. An analysis of the virus population on the level of the 100th passage on CEC at 30 °C by means of cloning showed a prevalence of particles avirulent for rabbits. By means of a triple plaque purification a virus clone was selected with the indication Buk-TK-300/9,2, being avirulent for rabbits at *i. m.*, *i. v.* and *i. perit.*, but having a residual neurovirulence at *i. cer. application*. The virulence of the clone remained unchanged after 10 passages on CEC at 37 °C. Rabbits and guinea-pigs inoculated with graded doses of the virus had neutralization antibodies (NA) in the blood serum the titres of which depended on the number of inoculations and the size of the vaccination dose. Animals with high NA titres in the blood serum inoculated twice resisted infection with a multiple lethal dose of the virus.

Aujeszky's virus; chick - embryo cells; passage at 30 °C; cloning; virulence; stability; immunogenicity; rabbits; guinea-pigs

ŽUFFA A. (Bioveta, Nitra, Tschechoslowakei). *Immunisierung gegen die Aujeszky'sche Krankheit — Isolierung eines für Kaninchen und Meerschweinchen avirulenten Klon und Bewertung dessen Immunogenität.* *Vet. Med. (Praha)* 16 (9) : 525-538, 1971.

Das Passagieren des attenuierten Aujeszky-Virus-Stammes (Buk-TK-200) auf Küken-embryozellkulturen (KEZ) bei 30 °C hatte eine weitere Abschwächung dessen Virulenz zur Folge. Durch die Analyse der Viruspopulation auf dem Niveau der 100. Passage auf KEZ bei 30 °C wurde ein Übergewicht der für Kaninchen avirulenten Partikelchen festgestellt. Durch dreifache Plaquespurifikation wurde ein als Buk-TK-300/9,2 bezeichneter, für Kaninchen bei *i. m.*, *i. v.* und *i. perit.* für Kaninchen avirulenter, aber bei *i. cer.* Verabreichung eine residuelle Neurovirulenz aufweisender Virusklon gewonnen. Die Virulenz des Klon blieb nach 10 Passagen auf KEZ bei 37 °C unverändert. Die mit abgestuften Virusdosen geimpften Kaninchen und Meerschweinchen enthielten im Blutserum Neutralisations-Antikörper (NA), deren Titer von der Anzahl der Inokulationen und der Größe der Vakzinationsdosis abhängig waren. Zweimal geimpfte Tiere mit hohen NA-Titern im Blutserum hielten der Infektion mit einer mehrfach letalen Virusdosis stand.

Aujeszky-Virus; Kükenembryozellen; Passagieren bei 30 °C; Klonen; Virulenz; Stabilität; Immunogenität; Kaninchen, Meerschweinchen

ŽUFFA A. (Bioveta, Nitra, Tchcoslovaquie). *Immunisation contre la maladie d'Aujeszky — isolement du clone avirulent pour les lapins et les cobayes et évaluation de son immunogénité.* *Vet. Med. (Prague)* 16 (9) : 525-538, 1971.

Les passages de la souche atténuée de virus d'Aujeszky (Buk-TK-200 sur les cul-



tures des cellules embryonnaires de poulets (CEP), effectués à la température de 30 °C, avaient pour conséquence l'affaiblissement de sa virulence. En effectuant l'analyse de la population à virus, au niveau de centième passage sur les cellules embryonnaires de poulets à la température de 30 °C, on a identifié par clonage la prédominance des particules avirulentes pour les lapins. En effectuant la purification triple de plaques, on a sélectionné le clone de virus, désigné Buk-TK-300/9,2, avirulent pour les lapins lorsqu'on l'appliquait par voie intramusculaire (*i. m.*), intraveineuse (*i. v.*), et intrapéritonéale (*i. p.*), mais que accusait une neurovirulence résiduelle quand on l'appliquait par voie intracérébrale (*i. cer.*). La virulence du clone est restée inchangée à la suite de dix passages effectués sur les cellules embryonnaires de poulets à la température de 37 °C. Les lapins et les cobayes, inoculés par des doses de virus progressives, accusaient dans le sérum sanguin des anticorps de neutralisation, dont les titres étaient en fonction du nombre d'inoculations et de l'importance de la dose de vaccination. Les animaux inoculés deux fois avec des anticorps de neutralisation à titres élevés dans le sérum sanguin, résistaient à l'infection que l'on cherchait à provoquer par la dose léthale multiple de virus.

virus d'Aujeszki; cellules embryonnaires de poulet; passages effectués à la température de 30 °C; clonage; virulence; stabilité; immunogénité; lapins; cobayes

---

*Adresa autora:*

Doc. MVDr. A. Žuffa, Csc., Bioveta, Nitra

---

# STABILIZACE BUNĚČNÝCH ELEMENTŮ MLÉKA A REPRODUKOVATELNOST ELEKTRONICKÉHO STANOVENÍ JEJICH POČTU

V. Renda, D. Ryšánek

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

---

RENDÁ V., RYŠÁNEK D. *Stabilizace buněčných elementů mléka a reprodukovatelnost elektronického stanovení jejich počtu.* Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 539-547, 1971.

Modifikací Tolleho metody, spočívající ve změně objemového poměru stabilizačního prostředku a mléka (1 : 250), jsme dosáhli proti přímé mikroskopické metodě Prescott-Breeda a proti Tolleho metodě nejmenší chyby. Koeficient variability pro celkovou šíři metody činil u postupu podle Prescott-Breeda 21 %, u Tolleho postupu 11,7 % a u modifikace 7,4 %. Prokázali jsme statistickou významnost snížení chyby metody u modifikace porovnáním variancí duplikátů *F*-testem. Rozdíl aritmetických průměrů z absolutních hodnot je statisticky nevýznamný ve stupních pozitivity 0, 1, 2, statisticky významná difference byla zjištěna u stupně 3 a 4.

skot; cytologie mléka; elektronické počítání buněk; diagnostika mastitis

---

K základům diagnostiky subklinických a klinických mastitid patří stanovení počtu buněčných elementů mléka. Kvantitativní mléčná cytologie byla až do roku 1965, kdy podává první zprávu o elektronickém stanovení počtu buněčných elementů Phipps a Newbould (1965), prováděna přímými mikroskopickými metodami, a to buď z odstředěného nebo z čerstvého mléka. Všechny tyto optické metody jsou však pro svoji velkou pracnost málo vhodné ke zpracování většího množství vzorků. Jejich další nevýhodou je relativně značná chyba metody. Nejrozšířenější je metoda podle Prescott-Breeda z r. 1910, která pracuje s čerstvým neodstředěným mlékem. Schneider a Jasper (1966) uvádějí chybu této metody  $\pm 10-20\%$ , Cullen (1965) až  $\pm 50\%$ . Metody pracující s odstředěným mlékem zavádějí další nepřesnost, poněvadž zanedbávají buněčné elementy strhávané při centrifugaci tukovou vrstvou a supernatantem, jak na to upozornil již v r. 1910 Prescott a Breed.

Z práce Schneidera a Jaspéra (1966), zabývající se reprodukovatelností přímé mikroskopické metody, je zřejmé, že je téměř vyloučeno snížit u této metody chybu pod  $\pm 15-20\%$ . U vzorků mléka s nízkým obsahem buněčných elementů (menším než 350 tis./ml) lze podle Newboulda a Phippse (1967) dosáhnout chyby  $\pm 15-20\%$  teprve vyhodnocením cca 1100 zorných polí na čtyřech duplikátech. Tento pracovní postup se však jeví pro sériovou práci jako naprosto neschůdný.

Nové možnosti ke zlepšení reprodukovatelnosti stanovení počtu buněčných elementů mléka přinesly metody používající automatických počítačů částic. Tyto počítače našly v posledních letech široké uplatnění v USA a NSR. Americkou

centrifugační metodu vyvinuli a rozpracovali Cullen (1965, 1966, 1967, 1968), Phipps a Newbould (1965, 1966), Read a kol. (1966, 1967). Metoda spočívá v odstředění mléka při standardní teplotě, v odstranění tukové vrstvy a v resuspendaci sedimentu fyziologickým roztokem.

Západoněmecká skupina pracovníků (Tolle a kol. 1966) používá k preparaci mléčných vzorků alkylfenolpolyglykoléteri a počítá na automatických počítačích typu Coulter-Counter. Podstatou jejich chemické metody je stabilizace a preparace buněčných elementů v čerstvém neodstředěném mléce vhodným emulgátorem, který rozptýlí a zmenší tukové kapénky pod hranici rozlišovací schopnosti počítače, takže nejsou potom registrovány.

Z dalších autorů, zabývajících se otázkou elektronického počítání buněčných elementů mléka chemickou metodou, můžeme uvést Kleinschrotha a kol. (1968) a Kleina a Thomase (1968).

Oba způsoby přípravy mléčných vzorků (centrifugační a chemický) k elektronickému stanovení počtu buněčných elementů porovnal v roce 1968 Phipps (1968). Z výsledků vyplývá, že korelace mezi oběma metodami byla velmi těsná. V reprodukovatelnosti měla podle Phippse (1968) centrifugační metoda lepší výsledky (S. D.  $\pm 0,078 \times 10^6/\text{ml}$ ; S. D.  $\pm 0,096 \times 10^6/\text{ml}$ ). Autor však nevyjadřuje chybu metody koeficientem variability. Reprodukovatelností chemické metody se zabýval Kleinschroth a kol. (1968), který zjistil, že výsledky získané touto metodou jsou dobře reprodukovatelné. Rovněž však nevyjadřuje chybu metody koeficientem variability. Terplan a Schleyerbach (1967) zjistili pro celkovou variační šíři metody variační koeficient 10,6 %, zatímco Tolle a kol. (1966) uvádějí hodnoty podstatně nižší. Otázka reprodukovatelnosti uvedených moderních metod zůstává tedy stále aktuálním problémem.

V naší práci jsme si proto vzali za úkol stanovit chybu chemické metody a upravit metodu tak, aby se koeficient variability pokud možno snížil pod 10 %.

## MATERIÁL A METODA

Použili jsme čtvrté vzorky mléka, získané od dojníc čs. červenostrakatého skotu v období od 4. týdne laktace do 25. týdne březosti. Nezpracovávali jsme vzorky mléka, které byly smyslově změněny. Odebrané vzorky jsme ve stáji i v laboratoři vyšetřili NK-mastitis testem (dále v textu NK-MT), což je československý analog CMT, který vyvinuli Neumann a Kudělka (1966), používající pětistupňového klasifikačního klíče podle Schalma a Noorlander (1957). Dále byly vzorky mléka vyšetřeny přímou mikroskopickou metodou podle Prescottta — Breeda (1910). Konečně jsme použili stanovení buněčných elementů automatickým počítačem „Celloscope 101“, a to jednak původní metodou podle Tolleho a kol. (1966), jednak námi modifikovanou Tolleho metodou. Byla dodržena zásada, aby vzorky každou metodou zpracoval pouze jeden pracovník.

### 1. STANOVENÍ POČTU BUNĚČNÝCH ELEMENTŮ MLÉKA PŘÍMOU MIKROSKOPICKOU METODOU

Použili jsme barvicího postupu podle Newboulda (1967) a vyhodnocování jednotlivých mikroskopických preparátů podle Prescottta a Breeda (1910).

## 2. STANOVENÍ BUNĚČNÝCH ELEMENTŮ MLÉKA AUTOMATICKÝM POČÍTAČEM

Použili jsme původní západoněmeckou metodu podle Tolleho (1966) a švédský automatický počítač „Celloscope 101“ (Lars Ljungberg & Co, Stockholm).

### a) Odběr vzorků

Vzorky mléka byly odebírány do sterilních zkumavek, uzavřených hliníkovými fóliemi. Po důkladném omytí mléčné žlázy se struky otřely lihobenzinem a mléko bylo nadojeno do šikmo skloněných zkumavek.

### b) Stabilizace vzorků mléka

K vzorkům byl přidáván přes filtr G 4 přefiltrovaný 10% roztok formalinu v poměru 1 : 500. Vzorky byly pak ponechány 24 hodiny při pokojové teplotě.

### c) Příprava elektrolytu

Ke 100 dílům 0,9% roztoku chloridu sodného byl přidán 1 díl 37% formalinu. Takto připravený elektrolyt se filtroval přes membránový filtr ( $\varnothing$  pórů  $0,22 \mu$ ) nebo přes porcelánový filtr (G 4, S 4). Byla dodržena zásada, aby po filtraci nebylo v uvedeném roztoku registrováno na počítači více než pět částic v rozsahu velikosti mléčných buněk. Připravený elektrolyt jsme po filtraci uchovávali v zásobě uložený v lednici.

### d) Příprava zředovacího média

Na 100 ml média:

86 ml elektrolytu,

2 ml emulgátoru (Triton X 100),

12 ml denaturovaného etylalkoholu, filtrovaného přes G 4 nebo S 4.

K elektrolytu jsme přidali nejdříve emulgátor, zahřáli ve vodní lázni při 55–60 °C po dobu 15 minut (za stálého míchání), potom jsme přidali etylalkohol.

Médium je třeba připravit pro každé počítání čerstvé a teplé je pipetovat do zkumavek. K médiu jsme přidali v poměru 1 : 80 stabilizované vzorky mléka, které se musí před pipetováním důkladně protřepat (1 min převracet o 180°). Potom jsme inkubovali 15 min ve vodní lázni 80 °C teplé. Během této doby se rozpustily tukové kapénky v mléce, což se projevilo vyjasněním vzorků. Opaleskující zákal po inkubaci je způsoben fixovanými částicemi kaseinu, které jsou však menší než je volený rozsah přístroje a neruší proto počítání. Vzorky jsme po vyjmutí z vodní lázně vychladili na pokojovou teplotu a do tří hodin po vychlazení spočítali.

### e) počítání vzorků na Celloscopu 101

Každý vzorek jsme před počítáním protřepali převrácením. Pracovali jsme s objemem 16–20 ml. Doba počítání jednoho vzorku činila 34 sek., hodnota diskriminátoru  $D = 110$ , regulátoru napětí = 79,5, použitá kapilára 70  $\mu$  (Tesař 1967). Jednotlivé vzorky jsme počítali v 25ml silikonovaných kádín-

kách. Jestliže se ucpala kapilára, otřeli jsme jemně její otvor bříškem prstu nebo profoukli injekční stříkačkou, opatřenou na kónusu polyetylénovou hadičkou. Mezi jednotlivými vzorky jsme proplachovali kapiláru přístroje fyziologickým roztokem. Po zpracování 500 vzorků jsme kapiláru vyjmuli a čistili v kyselině chromsírové.

### 3. ORGANIZACE POKUSU A STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

a) Výpočtem směrodatné odchylky a koeficientu variability jsme stanovili chybu metody Tolleho a přímé mikroskopické metody podle Prescottta-Breeda. K tomu jsme zpracovali celkem 540 základních hodnot (u obou metod v každém z pěti stupňů pozitivity devět vzorků po šesti duplikátech). Směrodatné odchylky a koeficienty variability byly vypočteny u jednotlivých stupňů pozitivity z duplikátů samostatně pro každý vzorek.

b) Vypracovali jsme modifikaci Tolleho metody.

c) Stanovili jsme chybu Tolleho metody a chybu modifikace Tolleho metody. K tomu jsme zpracovali celkem 360 základních hodnot (šest vzorků po šesti duplikátech v pěti stupních pozitivity u obou metod).

d) Hodnoty získané metodou Tolleho a modifikací Tolleho metody jsme kromě toho zpracovali analýzou rozptylu. Postupovali jsme tak proto, abychom — využívající aditivnosti jednotlivých komponent celkové variability — mohli vyjádřit míru proměnlivosti, způsobenou speciálně chybou metody, při současné eliminaci variability, která byla způsobena jednotlivými vzorky. To nám umožnilo vypočítat hodnoty směrodatných odchylek a koeficientů variability z variancí, charakterizujících jen proměnlivost způsobenou duplikáty. Abychom si ověřili statistickou významnost rozdílů mezi chybami srovnávaných metod v jednotlivých stupních pozitivity, podrobili jsme variance, vypočtené z hodnot duplikátů, *F*-testu. Postupovali jsme tak, že jsme příslušné variance, vypočtené pro Tolleho metodu, srovnali s hodnotami variancí, které byly vypočteny z výsledků modifikace Tolleho metody.

e) Absolutní hodnoty počtu buněčných elementů v 1 ml mléka u jednotlivých stupňů pozitivity jsme u Tolleho a modifikované metody srovnali Studentovým *t*-testem.

### VÝSLEDKY

Srovnáním chyby přímé mikroskopické metody podle Prescottta-Breeda a metody Tolleho ke stanovení počtu buněčných elementů v mléce jsme si ověřili fakt, že Tolleho metoda je zatížena podstatně nižší chybou.

V průběhu popsané práce jsme zjistili, že lepší stabilizace vzorků mléka lze dosáhnout při použití dvojnásobného množství 10% formalinu. Na základě tohoto poznatku jsme přikročili k následující úpravě Tolleho metody:

Změnili jsme poměr formalinu : mléku při stabilizaci vzorků na 1 : 250 (Tolleho metoda používá 1 : 500). Tento zásah značně snižuje chybu metody ve všech stupních pozitivity u jednotlivých vzorků.

Tab. I ukazuje rozdílné hodnoty koeficientů variability (*v*) u jednotlivých metod *P* — *B* = metoda Prescottta-Breeda, *T* = Tolleho metoda, *MT* = modifikovaná Tolleho metoda). Z tab. I vyplývá, že upravená chemická metoda Tolleho má nejnižší koeficient variability. Naopak výsledky získané metodou Prescottta-Breeda ukazují na velmi špatnou reprodukovatelnost.

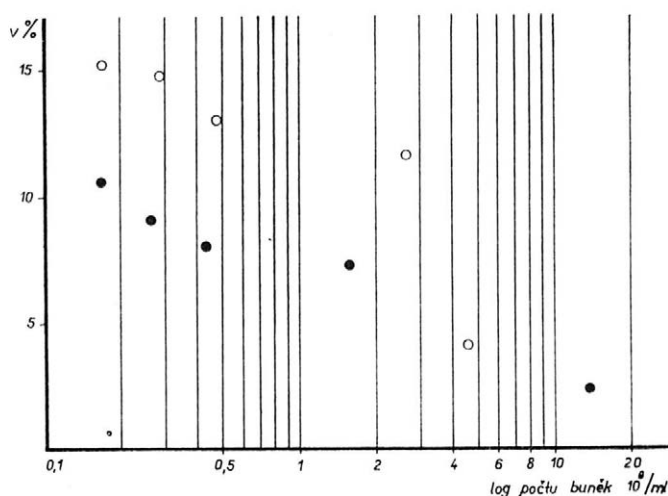
I. Chyba metody, vyjádřená koeficientem variability ( $v$ ) u přímé mikroskopické metody ( $P-B$ ), Tolleho metody ( $T$ ) a modifikace Tolleho metody ( $MT$ ), vypočteným z duplikátů

| Stupeň positivity $NK - MT$                     | $P - B$<br>$v$ | $T$<br>$v$ | $MT$<br>$v$ |
|-------------------------------------------------|----------------|------------|-------------|
| 0                                               | 32,4           | 15,3       | 10,6        |
| 1                                               | 29,8           | 14,8       | 9,1         |
| 2                                               | 22,4           | 12,9       | 8,1         |
| 3                                               | 10,7           | 11,5       | 7,3         |
| 4                                               | 10,0           | 4,2        | 2,3         |
| Koeficient variability pro celkovou šíři metody | 21,0           | 11,7       | 7,4         |

Koeficient variability činil pro celkovou šíři metody Prescottta-Breeda 21 %, u Tolleho metody 11,7 % a u modifikace Tolleho metody 7,4 %.

Z obr. 1 je výrazně patrné, že chyba metody klesá se stoupajícím počtem buněčných elementů, a to u Tolleho metody i u její modifikace, přičemž hodnoty koeficientů variability jsou u modifikace Tolleho metody podstatně nižší.

1. Vztah mezi chybou metody ( $v$  %) a log počtu buněčných elementů v 1 ml mléka (v milionech) podle stupňů positivity u obou metodických postupů (○ = Tolleho metoda, ● = modifikovaná Tolleho metoda)



Dále jsme přikročili k posouzení statistické významnosti rozdílu v chybě metody, které jsme provedli výpočtem variance ( $V$ ) z duplikátů u Tolleho metody ( $T$ ) a modifikace Tolleho metody ( $MT$ ) pomocí analýzy rozptylu a porovnáním variancí  $F$ -testem. Dosažené výsledky zahrnuje tab. II.

Z tabulky II je zřejmé, že snížení chyby metody, dosažené modifikací, je statisticky významné na všech stupních positivity  $NK - MT$ .

Při hodnocení výsledků jsme si položili otázku, zda modifikace neovlivní statisticky významně výsledky absolutních hodnot počtu buněčných elementů v jednom ml. Proto jsme další, v jednotlivých stupních positivity dosažené vý-



II. Průkaz statistické významnosti rozdílu v chybě metody, provedený výpočtem variance ( $V$ ) z duplikátů u Tolleho metody ( $T$ ) a modifikace Tolleho metody ( $MT$ ) a porovnáním  $F$ -testem

| Stupeň pozitivity<br>$NK - MT$ | $T$  |             | $MT$ |             | $T : MT$  |                        |
|--------------------------------|------|-------------|------|-------------|-----------|------------------------|
|                                | $v$  | $V$         | $v$  | $V$         | $F$ -test | statistická významnost |
| 0                              | 15,3 | 663,194     | 10,6 | 325,972     | 2,035     | +                      |
| 1                              | 14,8 | 1 997,777   | 9,1  | 593,611     | 3,365     | +                      |
| 2                              | 12,9 | 30 631,943  | 8,1  | 2 655,000   | 11,537    | +                      |
| 3                              | 11,5 | 115 915,330 | 7,3  | 13 601,943  | 8,522     | +                      |
| 4                              | 4,2  | 380 602,330 | 2,3  | 103 173,330 | 3,689     | +                      |

Tabelární hodnoty:  $F_{0,05} = 1,792$  Počet stupňů volnosti = 30  
 $F_{0,01} = 2,386$

III. Průkaz statistické nevýznamnosti rozdílu aritmetických průměrů absolutních hodnot Tolleho metody ( $T$ ) a modifikace Tolleho metody ( $MT$ ), provedený Studentovým  $t$ -testem; základní soubory zahrnují proměnlivost, způsobenou duplikáty i vzorky

| Stupeň pozitivity<br>$NK - MT$ | $T$                  |                     | $MT$                 |                     | $T : MT$  |                        |
|--------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------|------------------------|
|                                | Ø počet buněk v 1 ml | směrodatná odchylka | Ø počet buněk v 1 ml | směrodatná odchylka | $t$ -test | statistická významnost |
| 0                              | 173 000              | 45 510              | 170 000              | 35 260              | 0,313     | —                      |
| 1                              | 291 000              | 102 940             | 267 000              | 64 160              | 0,119     | —                      |
| 2                              | 480 000              | 103 450             | 440 000              | 334 210             | 0,684     | —                      |
| 3                              | 2 632 000            | 1 303 960           | 1 598 000            | 411 090             | 4,498     | +                      |
| 4                              | 4 666 000            | 1 144 290           | 13 695 000           | 5 909 440           | 9,029     | +                      |

Tabelární hodnota:  $t_{0,05} = 2,00$  Počet stupňů volnosti = 70

sledky, srovnali Studentovým  $t$ -testem. Pro přehlednost jsme dále vypočetli aritmetické průměry a směrodatné odchylky v jednotlivých stupních pozitivity u obou pracovních postupů a vynesli do tab. III.

Z tab. III vyplývá, že rozdíl aritmetických průměrů z absolutních hodnot je statisticky nevýznamný ve stupních pozitivity 0, 1, 2, statisticky významná difference byla zjištěna u stupně 3 a 4.

## DISKUSE

Pro kvantitativní vyšetření vzorků mléka na obsah buněčných elementů byla dosud v ČSSR používána přímá mikroskopická metoda podle Prescottta — Breeda. Autoři metody uvádějí její chybu  $\pm 14,5 \%$ , podle Schneidera a Jaspera (1966) činí chyba této metody  $\pm 10-20 \%$ , podle Cullena (1965) dokonce až  $\pm 50 \%$ , podle našich výsledků  $\pm 21 \%$ . Příčinu značné

chyby této metody můžeme vidět v ulpívání buněčných elementů na stěnách pipet, v nehomogenitě nátěrů mléka a v nedodržení jednotných kritérií při počítání buněčných elementů v zorných polích mikroskopu, jak popsali Schneider a Jasper (1966).

K rychlému sériovému cytologickému vyšetření vzorků mléka je mnohem vhodnější metoda elektronického počítání buněčných elementů. Na našem pracovišti jsme se rozhodli použít západoněmecký chemický způsob (Tolleho metodu) preparace mléčných vzorků, který není tak složitý a pracný jako americký centrifugační způsob. Vedle značné pracnosti americké metody považujeme za otevřený problém, zdali se nedopouští chyby tím, že část buněčných elementů zůstává při centrifugaci ve vrstvě smetany. Podle některých literárních pramenů, jako např. Kleinschroth a kol. (1968) je reprodukovatelnost u Tolleho metody dobrá. Autoři však bohužel neuvádějí konkrétní experimentálně zjištěné hodnoty. Jen Tolle a kol. (1966) udává koeficient variability nižší než 3 %.

Podle Terplana a Schleyerbacha (1967) je u duplikátů v nižších stupních pozitivity CMT  $v = 8,5 \%$  a ve vyšších stupních  $v = 3,5 \%$ . Pro celkovou variační šíři této metody zjistili uvedení autoři  $v = 10,6 \%$ . Při našich pokusech jsme dosáhli hodnoty koeficientu variability  $v = 7,4 \%$  pro celkovou variační šíři metody.

Naše zkušenosti s Tolleho metodou ukázaly, že je možné vhodnou modifikací snížit chybu metody pod 10 %. Dvojnásobným množstvím 10 % formalinu dochází, jak se domníváme, k dokonalejší stabilizaci buněčných elementů mléka, takže jsou potom automatickým počítačem lépe registrovány a mají menší tendenci se shlukovat. Při této úvaze jsme vyšli z jisté analogie, obsažené v práci Pirališviliho (1962), který s úspěchem použil formalinu ke stabilizaci eosinofilů.

Z uvedeného vyplývá, že modifikovaná Tolleho metoda stanovení počtu buněčných elementů v mléce svojí reprodukovatelností značně převyšuje přímou mikroskopickou metodu a při použití „Celloskopu 101“ se nejvíce blíží údajům reprodukovatelnosti, které publikovali Terplan a Schleyerbach (1967).

## Literatura

- CULLEN G. A., 1965, The use of electronic counters for determining the numbers of cells in milk. Vet. Rec. 77 : 858-859.  
CULLEN G. A., 1966, Cells in milk. Vet. Bull. 5 : 337-346.  
CULLEN G. A., 1967, A method of counting cells in milk using an electronic cell counter. Vet. Rec. 80 : 188-194.  
CULLEN G. A., 1968, Cell counts through lactation. Physiological variation in the cell count of cows milk during lactation. Vet. Rec. 83 : 125-128.  
KLEIN H., THOMAS H. J., 1968, Zur Frage der Qualitätseinstufung der Anlieferungsmilch mittels der elektronischen Zellzählung. Milchwissenschaft 23 : 153-156.  
KLEINSCHROTH E., RICHTER O., SCHUMANN H., 1968, Die Anwendung der elektronischen Bestimmung des Milchzellgehaltes im Eutergesundheitsdienst und bei der Qualitätsüberwachung der Milch. Milchwissenschaft 23 : 147-153.  
NEWBOULD F. H. S., PHIPPS L. W., 1967, An improved technique for counting leucocytes in milk by the direct microscopic method. Can. J. Comp. Med. 31 : 65-69.  
NEUMAN K., KUDĚLKA U., 1966, Dílčí závěrečná zpráva úkolu A-2-13-6/3 Brno, 76 s.  
PHIPPS L. W., 1968, Electronic counting of cells in milk examination of a chemical treatment for dispersal of milk fat. J. Dairy Res. 35 : 295-302.

- PHIPPS L. W., NEWBOULD F. H. S., 1965, Isolation and electronic counting of leucocytes in sow's milk. *Vet. Rec.* 77 : 1377-1378.
- PHIPPS L. W., NEWBOULD F. H. S., 1966, Determination of leucocyte concentrations in cows milk with a coulter counter. *J. Dairy Res.* 33 : 51-65.
- PIRALIŠVILI I. S., 1962, K metodike podsčeta eosinifolov v periferičeskoj krvi. *Labor. delo* 20 : 20-22.
- PRESCOTT S. C., BREED R. S., 1910, The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *J. Infect. Dis.* 7 : 632-640.
- READ R. B., REYES A. J. L., BRADSHAW S. G., PELLER J. T., 1966, Electronic counting of somatic cells in milk. *J. Dairy Sci.* 49 : 704.
- READ R. B., REYES A. J. L., BRADSHAW S. G., PELLER J. T., 1967, Electronic counting of somatic cells in milk. *J. Dairy Sci.* 50 : 669-674.
- SCHALM O. W., NOORLANDER D. O., 1957, Experiment and observations leading to the development of the California mastitis test. *J. Am. vet. med. Ass.* 130 : 199-204.
- SCHNEIDER R., JASPER D. E., 1966, Some factors responsible for variation in counting somatic cells on Prescott-Brees smears of milk. *J. Milk. Fd. Technol.* 29 : 5-9.
- SLANINA L., KUDĚLKA E., 1967, Cytologické vyšetření mléka. *Veterinářství* 7 : 300-303.
- TERPLAN G., SCHLEIYERBACH R., 1967, Untersuchung zur elektronischen Zellzahlbestimmung: Brabanter Mastitis Reaktion, Whiteside-Mastitis-Test und Labgerinnungszeit der Milch. *Arch. Lebensmittelhyg.* 18 : 195-201.
- TESAŘ A., 1967, Použití emulgátorů k úpravě mléčných vzorků při stanovení počtu buněčných elementů na automatickém počítači „Celloscope 101“. Ústavní úkol Ú-D-5/67, Praha.
- TOLLE A., ZEIDLER H., HEESCHEN W., 1966, Verbesserte Präparationstechnik zur elektronischen Bestimmung des Zellgehaltes in Milch. *Milchwissenschaft* 23 : 564-568.

Došlo dne 15. 4. 1971

---

РЕНДА В., РЫШАНЕК Д. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Стабилизация клеточных элементов молока и воспроизводительность электронного определения их числа. *Vet. Med. (Praha)* 16 (9) : 539-547, 1971.

Модификацией метода Толля, заключающейся в изменении объемного соотношения стабилизационного средства и молока (1 : 250), мы достигли минимальной ошибки метода по сравнению с непосредственным микроскопическим методом Прескотта-Брида и Толля. Коэффициент изменчивости для общего метода Прескотта-Брида составлял 21 %, для метода Толля — 11,7 % и у модификации 7,4 %. Нами была доказана статистическая значимость уменьшения ошибки метода у модификации путем сопоставления дисперсии дубликатов F-тестом. Разность арифметических средних абсолютных значений статистически незначима в ступенях положительности 0, 1, 2; статистически значимая дифференциация была установлена у ступеней 3 и 4.

крупный рогатый скот; цитология молока; электронный подсчет клеток; диагностика мастита

RENDA V., RYŠÁNEK D. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). *Stabilization of Milk Cell Elements and the Reproducibility of the Electronic Determination of their Number.* *Vet. Med. (Praha)* 16 (9) : 539-547, 1971.

By means of a modification of Tolle's system consisting of a change of the volume ratio of the stabilization agent and milk (1 : 250) the lowest error of system was achieved compared to the direct microscopic system of Prescott-Breed and Tolle's system. The variability coefficient for the whole span of the system amounted to 21 % with proceedings according to Prescott-Breed, to 11,7 with Tolle's proceedings and to 7,4 % with the modification. We proved a statistical significance of the decrease in the error of the system with the modification by means of a comparison

of duplicate variances with the F-test. The difference in arithmetical averages of absolute values is statistically insignificant in positivity grades 0, 1, 2, a statistically significant difference was determined in grades 3 and 4.

cattle; milk cytology; electronic counting of cells; diagnosis of mastitis

RENDA V., RYŠÁNEK D. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Stabilisierung der Milchzellenelemente und Reproduzierbarkeit der elektronischen Bestimmung ihrer Anzahl*. Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 539-547, 1971.

Mittels Modifikation der Toll-Methode, die auf der Veränderung des Volumenverhältnisses des Milchstabilisierungsmittels (1 : 250) beruht, haben wir gegenüber der direkten mikroskopischen Prescott-Breed-Methode und der Toll-Methode die niedrigsten Fehler der Methode erreicht. Der Variabilitätskoeffizient für die gesamte Spanne der Methode betrug beim Vorgang nach Prescott-Breed 21 %, beim Vorgang nach Toll 11,7 % und bei der Modifikation 7,4 %. Wir haben eine statistische Bedeutung der Methodenfehlerherabsetzung bei der Modifikation durch den Vergleich der Varianzen von Duplikaten mittels F-Test nachgewiesen. Der Unterschied der arithmetischen Durchmesser aus den absoluten Werten ist in den Positivitätsgraden 0, 1, 2 statistisch nicht von Bedeutung, eine statistisch signifikante Differenz wurde beim Grad 3 und 4 festgestellt.

Rind; Milchzytologie; elektronische Zellenzählung; Mastitisdiagnostik

---

*Adresa autorů:*

MVDr. V. Renda, MVDr. D. Ryšánek, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno - Medlánky

---

**Výběr z nových přírůstků**  
**Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTI**  
**na úseku veterinářství**

- D 58.821
- Problemy zoogigijeny i veterinarnoj sanitarii na životnovodčeskich fermach.** Moskva, Kolos 1970. 294 s. obr., tab. Vses. akad. s -ch. nauk im V. I. Lenina, Otdel. životnovodstva. (Veterinární hygiena — sborníky)
- E 34.202
- Aa, R. von der  
**Veterinärhygienische Arbeitsmethoden.** Jena, VEB G. Fischer 1969. 163 s. 39 obr. 28 tb. (Veterinární hygiena / Stájové klima — příručky)
- E 34.140
- Petrov, K. — Petkov, G. — Stojanov, P.  
**Zoohigiena v yedrenite životnovadni fermi.** Sofija, Dăržavno izd. za s. -st. literatura 1969. 355 s. 45 obr. 38 tb. (Veterinární hygiena — příručky)
- C 19.558/3/3
- Baier, W.  
**Hygienic care of cattle for milk and meat production in large units.** Helsinki, E. A. A. P. 1969. 10 s. 23-26 June 1969. (Kravíny velkokapacitní — hygiena — brožury)
- C 19.558/9/3
- Schulman, A.  
**Healthy management of large-scale pig production.** Helsinki, E. A. A. P. 1969. 4 s. Helsinki, 23 - 26 June 1969. (Prase — chov — hygiena — Finsko)
- C 19.558/5/3
- Schaupp, W.  
**Sanitary problems of large-scale pig production in Austria.** Helsinki, E. A. A. P. 1969. 9 s. Helsinki, 23 - 26 June 1969. (Prase — chov — hygiena — Rakousko)
- D 59.064
- Kulczycki, J.  
**Diagnostyka chirurgiczna zwierząt domowych (koni i bydła).** Warszawa, PWN 1970. 262 s. 88 obr. (Veterinární diagnostika — příručky)

# ZHODNOCENÍ NĚKTERÝCH REPRODUKČNÍCH VLASTNOSTÍ BÝKŮ AMERICKÉHO ZEBU

O. Čermák

*Střední zemědělská technická škola, Boskovice*

---

ČERMÁK O. *Zhodnocení některých reprodukčních vlastností býků amerického zebu.* Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 549-562, 1971.

Na základě biometrických, histologických a fyziologických pozorování byla sledována plodnost býků amerického zebu v tropických podmínkách Kuby. Úroveň plodnosti je srovnatelná s plemeny mléčnými jak domácími, tak importovanými. Na rozdíl od nich však klesala v jarních měsících (v březnu a v dubnu) a nikoliv v měsících nejteplejších. Tato skutečnost je přičítána na vrub jisté plemenné primitivnosti. Snížená fertilita totiž souvisí s obdobím nedostatku potravy a vody a nelze ji upravit ani zlepšením chovných a výživných poměrů.

fertilita; biometrika; histologie; varlata; nadvarlata; spermiogram; vezikuly; fruktóza; klima; tropické pásmo

---

V plodnosti plemeníků i v jakosti jejich spermatu se projevuje zřetelný vliv klimatických činitelů, jež se uplatňují jak v různých zeměpisných šířkách, tak i v průběhu roku v tomtéž klimatickém pásmu. Tepelná složka podnebí působí především na spermiogenní činnost varlat, světlo pak přes zrak na gonadotropní aktivitu hypofýzy. V tropických a subtropických podmínkách nabývají tyto složky na významu při zavádění umělé inseminace, jejíž úspěch je do značné míry závislý na znalostech a využití uvedených skutečností.

Pokud jde o býky, existuje v tomto směru řada údajů, z nichž některé v přehledu uvádíme. Tak např. Stief (1953 — cit. Hafez 1962) pozoroval, že na jaře bývá objem ejakulátů nejvyšší a množství abnormálních spermií nejnižší. Rovněž Johnston a Branton (1953) prokázali podobné změny u 14 sledovaných guernseyských, holštýnsko-frýských a jerseykých býků. Schmidt v roce 1954 studoval vliv délky světelného dne a teploty na fertilitu býků. Shledal pozitivní korelaci mezi těmito faktory a mezi koncentrací spermií, jejich přežitelností a plodností. Schindler (1954) zjistil v Izraeli nejvyšší plodnost od března do května a nejnižší v září. Nepozoroval však rozdíly v objemu ejakulátů během jednotlivých měsíců. Další autoři (Hafez, Bonadonna 1958 a Bonadonna 1963) uvádějí, že během letních měsíců dochází ke snížení kvalitativních i kvantitativních vlastností spermatu, až na objem ejakulátů, který se lehce zvyšuje. Bonadonna (1963) současně tvrdí, že příliš jasné sluneční záření vyvolává poruchu spermiogeneze i pohlavní aktivity. Tím vysvětluje i častou impotenci býků dovezených z mírných pásem do podnebí tropického. Jeho vývoody jsou podporovány studiemi Ortavanta (1958, 1962), jenž sledoval vliv fotoperiod na spermatogenní činnost



u beranů. Zjistil, že úroveň dělení primárních spermatocytů a doba následujícího dozrávání nebyla fotoperiodou relativně narušena, avšak snížil se počet spermatid, které dosahovaly úplné zralosti. Dvanáctihodinové denní osvětlení (zkoušel osmi až šestnáctihodinové fotoperiody po třech měsících) dávalo optimální podněty ke spermiogenezi. Konstantní udržování fotoperiody po dobu 35 až 40 dní působilo snížení spermiogeneze.

Sezónní změny v kvalitě spermatu nejsou spojeny se změnami fruktózy ve spermatu, což by nasvědčovalo, že sekrece testosteronu není narušena (Cupps a kol. 1960). Pokud se týká metabolické činnosti spermií, zjistili Makabayashi a Salisbury (1956), že sperma odebírané v zimě spotřebovalo o 62 % více fruktózy a vytvářelo o 69 % více kyseliny mléčné než sperma odebrané v létě. Koncepce po spermatu odebíraném na podzim byla vyšší, v zimě nižší (Jaskowski a Walkowski 1960). K podobným závěrům o ročním rozložení plodnosti dospěli již dříve Erb a kol. (1942), Morgan a Davis (1938), Phillips a McKenzie (1934), Schultze a kol. (1948), Weeth a Herman (1949) a ve stejné době Schinckel (1954). Vliv atmosférického tlaku na plodnost studovali Müller a Höhn (1954). Prokázali pozitivní korelaci mezi atmosférickým tlakem a plodností.

Tropické sezónní změny v kvalitě spermatu u domácích býků a buvolů jsou poměrně přesně popsány zásluhou Roye (1959 — cit. podle Maula 1962), který rozděluje tropický rok takto: zima — od 21. listopadu do 10. února; jaro — od 11. února do 15. dubna; léto — od 16. dubna do 15. července; doba dešťů — od 16. července do 7. října; podzim — od 8. října do 20. listopadu. V tabulce I uvádí spermiologické hodnoty zjištěné u býků a buvolů chovaných v indii.

Pattel (1959 — cit. Maule 1962) pozoroval, že u Surtiho buvolů byl objem spermatu nejvyšší v létě (květen, červen, červenec) a nejnižší v zimě (listopad, prosinec, leden). Kushwaha a kol. (1955) však nenašel sezónní rozdíly v objemu spermatu u buvola egyptského (buvol Marrah), avšak stejně jako Oloufa a kol. (1959) potvrzuje jinak lepší kvalitu spermatu egyptských buvolů v létě než v zimě. Bhatnagar a kol. (1955) provedli histologické studie štítné žlázy a varlat indických buvolů během různých ročních období. Shledali, že změny ve štítné žláze souvisejí se sezónními změnami ve spermiogenezi. Vzestup nebo pokles aktivity štítné žlázy souvisel s lepší či horší kvalitou spermatu.

U býků se zdá, že existuje jistý věkový rozdíl v plodnosti během různých ročních období. U býků středně starých bylo pozorováno (Mercier a Salisbury 1947), že období jejich nejnižší plodnosti spadá do zimy; zlepšení nastává na jaře a dosahuje nejvyšší úrovně v létě a na podzim. Naproti tomu u mladých býčků (mladších než čtyři roky) dosahuje plodnost vrcholu v zimě, klesá v nejteplejších letních měsících a opět stoupá na podzim. Uvedení autoři docházejí k závěru, že mladí plemeničí jsou citlivější k teplotním vlivům než býci starší. Johnston a Branton (1953) zkoumali v Louisianě vliv teploty a vlhkosti vzduchu na fertilitu plemenků dojných plemen. Zjistili prokazatelně negativní vztah mezi plodností a maximálními denními teplotami ( $r = -0,46$ ), minimálními denními teplotami ( $r = -0,45$ ) a tlakem vodních par ( $r = -0,55$ ). Stoupá-li tedy teplota a vlhkost, klesá plodnost a naopak. Miličevič a kol. (1968) ze svých pozorování vyvozují, že teplota prostředí má vliv zvláště na pH a objem ejakulátů, na pohyblivost a koeficient životnosti spermií. Ostatní vlastnosti spermatu nejsou narušeny. Mimořádně nízké a vysoké teploty působí depresivně na jmenované vlastnosti, dále pak na libido a na

I. Sezónní změny v kvalitě spermatu u býků a buvolů (R o y 1959)

| Spermiologické hodnoty                                      |       | Zima                 | Jaro                 | Léto                 | Období dešťů         | Podzim               |
|-------------------------------------------------------------|-------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Hustota spermii v 1 ml $\times 10^6$                        | buvol | 1295,70 $\pm$ 124,70 | 1563,20 $\pm$ 191,60 | 1277,40 $\pm$ 117,60 | 1040,30 $\pm$ 114,70 | 1098,00 $\pm$ 125,30 |
|                                                             | býk   | 1638,80 $\pm$ 65,20  | 1530,70 $\pm$ 100,70 | 1456,20 $\pm$ 106,40 | 1277,70 $\pm$ 119,70 | 1037,50 $\pm$ 189,90 |
| Množství živých spermii v 1 ml                              | buvol | 896,80 $\pm$ 100,30  | 1034,90 $\pm$ 172,90 | 798,40 $\pm$ 89,70   | 809,30 $\pm$ 81,60   | 952,20 $\pm$ 125,70  |
|                                                             | býk   | 1190,30 $\pm$ 66,20  | 1139,00 $\pm$ 55,00  | 1030,40 $\pm$ 119,40 | 1070,80 $\pm$ 108,10 | 825,10 $\pm$ 162,40  |
| % živých spermii                                            | buvol | 69,00 $\pm$ 3,00     | 62,20 $\pm$ 3,90     | 63,20 $\pm$ 4,60     | 79,20 $\pm$ 2,30     | 82,80 $\pm$ 1,80     |
|                                                             | býk   | 73,90 $\pm$ 2,70     | 75,10 $\pm$ 2,80     | 67,00 $\pm$ 4,60     | 77,50 $\pm$ 4,70     | 72,40 $\pm$ 3,30     |
| % abnormálních spermii (všech)                              | buvol | 23,60 $\pm$ 2,10     | 21,10 $\pm$ 2,50     | 15,20 $\pm$ 2,20     | 10,10 $\pm$ 1,10     | 12,40 $\pm$ 2,90     |
|                                                             | býk   | 22,30 $\pm$ 2,30     | 14,00 $\pm$ 1,90     | 11,60 $\pm$ 2,50     | 12,70 $\pm$ 2,80     | 17,80 $\pm$ 3,80     |
| % živých abnormálních spermii                               | buvol | 20,60 $\pm$ 7,40     | 13,20 $\pm$ 2,00     | 5,00 $\pm$ 0,30      | 6,00 $\pm$ 0,80      | 3,90 $\pm$ 0,70      |
|                                                             | býk   | 12,60 $\pm$ 4,60     | 8,90 $\pm$ 1,40      | 4,30 $\pm$ 0,90      | 5,90 $\pm$ 1,30      | 9,40 $\pm$ 4,30      |
| Index fruktolýzy v 1. hodině                                | buvol | 1,81 $\pm$ 0,16      | 1,17 $\pm$ 0,17      | 1,31 $\pm$ 0,17      | 1,73 $\pm$ 0,37      | 1,27 $\pm$ 0,24      |
|                                                             | býk   | 2,09 $\pm$ 0,19      | 1,86 $\pm$ 0,24      | 1,54 $\pm$ 0,18      | 1,66 $\pm$ 0,22      | 1,81 $\pm$ 0,17      |
| Spotřeba O <sub>2</sub> v ml 5 $\times$ 10 spermii ředěných | buvol | 101,80 $\pm$ 17,80   |                      | 38,04 $\pm$ 4,90     |                      |                      |
|                                                             | býk   | 151,20 $\pm$ 19,20   |                      | 105,20 $\pm$ 13,90   |                      |                      |

fertilitu plemeníků. Plodnost býků byla nejvyšší při průměrných teplotách 12 až 14 °C. Rytmus průměrných měsíčních teplot od 2,1 do 21,6 °C v mírném podnebí Jugoslávie nezpůsobuje vážnější poruchy spermiogeneze.

V letech 1963—1964 hodnotil na Kubě ejakuláty importovaných plemeníků holštýnských Kaňka (osobní sdělení). K pozorování použil býků působících v inseminaci nejméně osm měsíců v každém roce. Zjistil, že v nejteplejších měsících od května do října s maximem v srpnu a v měsících s nejvyšší relativní vlhkostí (od června do října, s maximem v září) dávali býci nejhorší sperma, pokud se týká jeho denzity a pohyblivosti. Narušena byla více hustota, která byla pod ročním průměrem v červnu, tj. v měsíci s průměrnou teplotou 26,4 °C. Pohyblivost spermií byla nejnižší v srpnu, kdy teploty vzduchu dosáhly maxima. Sullivan a Elliot (1968) sledovali plodnost devíti býků během celého roku. Z rozboru 15 130 prvních inseminací vyplývá, že fertilita spermatu produkovaného v jarních a letních měsících (od dubna do září) byla prokazatelně nižší než spermatu vyprodukovaného v říjnu až březnu. Býci byli po celý rok chováni v tepelně kontrolované stáji při teplotě 14 až 23 °C. Jinou zprávu předložil Dimitropulos z Belgie (1968), jež leží kolem 51. stupně severní šířky. Konstatuje, že:

1. plodnost býků je stejná po celý rok a není ovlivněna ročními obdobími,

2. sezónní kolísání plodnosti ovlivňují především faktory samičí. Podobně Hultnäs a Ström (1968) ze středního Švédska nezjistili u 66 býků s 55 378 inseminacemi sezónní změny v jejich plodnosti.

Při svém pobytu v Kubánské republice v letech 1967 a 1968 jsem měl příležitost prostudovat některé aspekty sezónní plodnosti u tamního nejrozšířenějšího a hospodářsky nejvýznamnějšího skotu zebu.

## MATERIAL A METODY

Vzhledem k tomu, že pro známé technické potíže spojené s odběrem spermatu od brahmanských býků nebylo možné získat dostatek průkazného materiálu, přistoupili jsme k hodnocení některých morfologických a fyziologických vlastností genitálních orgánů těchto býků po porážce. K hodnocení jsme používali býky ze žíru, kteří po předchozím výhradně pastevním odchovu byli zařazováni k dokrmení ve stáří 1—1,5 roku. Po dosažení váhy 780—850 liber (1 libra = 460 g), tj. ve stáří 2—2,5 roku (kontrolováno podle chrupu) byli poráženi. Krmné dávky po dobu výkrmu byly následující: 70 liber zelené píce (převážně pangoly — *dig. decumbens* —, která má přibližně stejný obsah živin jako naše luční tráva), 6 liber melasy a 1,5 libry jadrné směsi s minerální přísadou (skladba směsi: 30 % kukuřičného šrotu, 15 % sojového šrotu, 10 % krmné mouky, 5 % minerálních solí a 40 % melasy; tato směs obsahovala cca 40 % škrobových jednotek a 8 % bílkovin). Z jatečných býčků bylo každý měsíc (vždy v posledním týdnu) při porážce vybráno 16 zdravých, normálně vyvinutých zvířat a jejich pohlavní orgány byly vyšetřeny následovně: těsně po porážce (do 15 minut) byla zjištěna pohyblivost spermií z každé ampuly chámovodové a na rozřezu bylo spočítáno množství spermií chorobně změněných a nezralých. Dále byla změřena délka, šířka a hloubka varlat, šířka a výška ocasu nadvarlete, délka a šířka semenných váčků. Vzájemným vynásobením uvedených rozměrů jsme vypočítali tzv. index objemu těchto orgánů. Z každého semenného váčku byl odebrán sekret a tentýž den v něm byl stanoven obsah fruktózy fotokolorimetricky podle Manna. Dále byly od šesti namátkově vybraných býků získány

vzorky vždy z pravého varlete a ocasu nadvarlete k histologickému vyšetření. Na řezech jsme měřili velikost průsvitu točitých kanálků varlete, vyjádřenou násobkem délky a šířky průřezu a počítali jsme množství zárodečných buněk (spermatogonií, spermatocytů a spermatid) v každém průřezu. Průměr byl vy počítáván vždy z 20 průřezů kanálky v každém varleti. Kromě toho byly v každém průřezu počítány Leydigovy buňky a z nich ještě procento buněk vakuolizovaných. Na řezech nadvarletem byla rovněž měřena délka a šířka lumen kanálků, tloušťka jejich stěny, výška epitelu a byl zjišťován obsah spermií v nich. Tento obsah byl vyjadřován procentem výskytu řezů se shlukem spermií uprostřed z celkového počtu 20 průřezů vývodu nadvarleťními v každém nadvarleti. Uvedená vyšetření byla doplněna spermio logickými hodnotami tří brahmanských plemenů, kteří působili na plemenářské stanici v havanské provincii. Celkem bylo od nich během roku získáno 75 ejakulátů. Meteorologické údaje jsme obdrželi ze Státního ústavu meteorologického v Havaně.

Pro naše účely jsme tropický rok rozdělili na pět částí: 1 — prosinec, leden, únor; 2 — březen, duben; 3 — květen, červen, červenec; 4 — srpen, září; 5 — říjen, listopad.

## VÝSLEDKY

Testimetrické hodnoty brahmanských býků, zjišťované v jednotlivých ročních obdobích, daly stejné výsledky jak v objemu, tak v šířce varlat, takže nebyly shledány prokazatelné rozdíly mezi sledovanými měsíci. Poněkud jiná situace byla u nadvarlat a semenných vezikul. Nejmenší index objemu nadvarlat jsme zjistili v srpnu a v září ( $P < 0,01$ ), nejmenší rozměry semenných váčků v měsících březnu a dubnu ( $P = 0,001$ ) — tab. II.

### II. Velikost genitálií v jednotlivých ročních obdobích (býci zebu)

| Měsíc                    | Počet zvířat | Orgány pravostranné |          |              |          |          | Orgány levostranné |          |              |          |       |
|--------------------------|--------------|---------------------|----------|--------------|----------|----------|--------------------|----------|--------------|----------|-------|
|                          |              | varle               |          | nad-varle    | vezikula |          | varle              |          | nad-varle    | vezikula |       |
|                          |              | index objemu        | šířka cm | index objemu | délka cm | šířka cm | index objemu       | šířka cm | index objemu | délka    | šířka |
| Prosinec, leden, únor    | 32           | 396                 | 5,3      | 5,0          | 9,4      | 1,9      | 394                | 5,3      | 4,7          | 9,1      | 1,8   |
| Březen, duben            | 28           | 396                 | 5,6      | 4,6          | 8,2      | 1,7      | 395                | 5,5      | 4,5          | 8,0      | 1,7   |
| Květen, červen, červenec | 47           | 428                 | 5,9      | 4,3          | 9,1      | 2,2      | 427                | 5,8      | 4,2          | 8,6      | 2,0   |
| Srpen, září              | 30           | 436                 | 5,7      | 3,7          | 8,9      | 2,0      | 420                | 5,6      | 3,8          | 9,0      | 1,8   |
| Říjen, listopad          | 31           | 386                 | 5,4      | 4,3          | 9,2      | 2,0      | 381                | 5,4      | 4,5          | 9,2      | 2,0   |

Při mikroskopickém vyšetřování tkáně varlat se objevilo prokazatelné zmenšení světlosti tubulů ( $P = 0,05$ ) a počtu zárodečných buněk (obr. 1) v březnu a dubnu ( $P < 0,001$ ), kdežto množství intersticiálních buněk Leydigových (jak vakuolizovaných, tak malých) zůstávalo po celý rok na stejné úrovni. Přitom ve



a



b



c



d

1. Průřez tubuly varlat v jednotlivých ročních obdobích

a — prosinec, leden, únor

b — březen, duben

c — květen, červen, červenec

d — srpen, září



a



b



c

2. Průřez nadvarletním vývodem v jednotlivých ročních obdobích

a — prosinec, leden, únor

b — březen, duben

c — květen, červen, červenec

všech měřeních převládaly zvětšené buňky s vakuolami v cytoplasmě. Lumen vývodu nadvarletního v ocasu nadvarlete rovněž nedoznal sezónních změn. Stěna tohoto vývodu byla stejně silná ve všech obdobích s výjimkou jarního (březen, duben), kdy se její tloušťka téměř zdvojnásobila ( $P = 0,05$ ) v důsledku zmnožení vaziva (obr. 2), kdežto výška epitelu ve srovnání s ostatními měsíci naopak poklesla. Množství chorobně změněných spermií (počítáno z obou ampul Henleových dohromady) bylo nejnižší v srpnu a v září, kdežto v ostatních obdobích zůstávalo na stejné úrovni. Uvedené mikroskopické změny jsou zachyceny v tabulce III.

### III. Sezónní změny ve varlatech a nadvarlatech (býci zebu)

| Měsíc                          | Varle                    |                            |                                            |                                   |                                   | Nadvarle                          |                           |                 |                    | Ampula<br>Henleova<br>%<br>patologických<br>spermii |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------|--------------------|-----------------------------------------------------|
|                                | index průsvitu<br>tubulů | počet zárodečných<br>buněk | počet Leydigových<br>buněk vakuolizovaných | počet Leydigových<br>buněk malých | počet Leydigových<br>buněk celkem | index průsvitu<br>vývodu nadvarle | přítomnost spermií<br>v % | síla stěny v mm | výška epitelu v mm |                                                     |
| Prosinec,<br>leden,<br>únor    | 0,0508                   | 134                        | 8,3                                        | 2,3                               | 10,6                              | 0,2576                            | 80                        | 0,0569          | 0,0369             | 17,3                                                |
| Březen,<br>duben               | 0,0334                   | 91                         | 10,0                                       | 6,0                               | 16,0                              | 0,3921                            | 80                        | 0,1144          | 0,0280             | 16,7                                                |
| Květen,<br>červen,<br>červenec | 0,0467                   | 138                        | 10,7                                       | 9,3                               | 20,0                              | 0,3443                            | 57                        | 0,0696          | 0,0354             | 15,8                                                |
| Srpen,<br>září                 | 0,0631                   | 140                        | 10,0                                       | 5,0                               | 15,0                              | 0,2483                            | 60                        | 0,0681          | 0,0373             | 6,9                                                 |
| Říjen,<br>listopad             | 0,0441                   | 125                        | 9,0                                        | 3,5                               | 12,5                              | 0,2321                            | 53                        | 0,0552          | 0,0331             | 13,7                                                |

Jak vyplývá z tabulky IV, koncentrace fruktózy ve vezikulách byla nejnižší v jarních měsících (březnu a dubnu) — ( $P < 0,02$ ). Ve všech ostatních obdobích byla na stejné úrovni.

Dále nás zajímalo, zda existuje vztah mezi objemem varlat a velikostí průsvitu točitých kanálků včetně množství zárodečných buněk. Jak je znázorněno na obr. 3., s růstem indexu objemu varlat roste světlost tubulů, avšak kolísá množství zárodečných buněk v nich. Tyto buňky se množí v závislosti na velikosti lumen tubulů až do 0,06 (obr. 4). Popsaná závislost je v souladu s výsledky získanými u rostoucích býčků (Čermák 1970).

Porovnáme-li biometrické údaje získané z vývodu nadvarletního v krajině ocasu nadvarle s indexem objemu ocasu nadvarle (vyjádřeným násobkem jeho šířky a výšky), vidíme, že se stoupajícím indexem objemu klesal průsvit nadvarletního vývodu a výška jeho epitelu až k indexu 4,2. K číslu 5,8 tyto hodnoty nepatrně vystoupily.

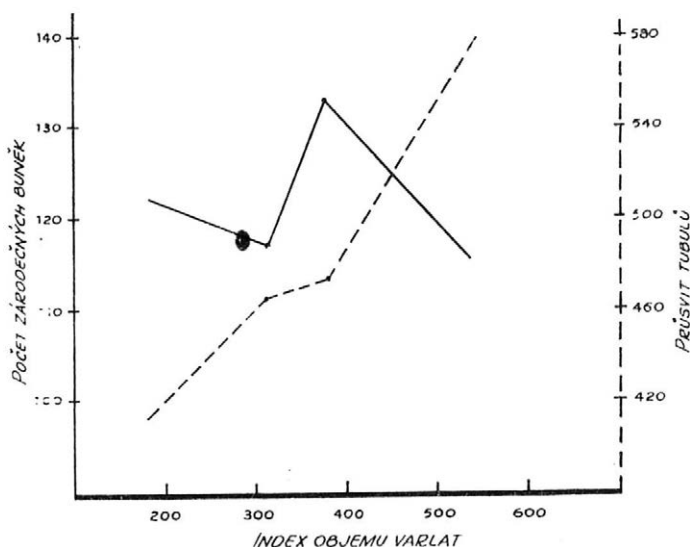
### IV. Sezónní změny v obsahu fruktózy ve vezikulách (býci zebu)

| Měsíc                          | Fruktóza v mg%                |                              | Počet<br>zvířat |
|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------|
|                                | vezikula<br>pravo-<br>stranná | vezikula<br>levo-<br>stranná |                 |
| Prosinec,<br>leden,<br>únor    | 369                           | 325                          | 48              |
| Březen,<br>duben               | 280                           | 243                          | 32              |
| Květen,<br>červen,<br>červenec | 354                           | 375                          | 56              |
| Srpen,<br>září                 | 373                           | 376                          | 30              |
| Říjen,<br>listopad             | 331                           | 314                          | 31              |

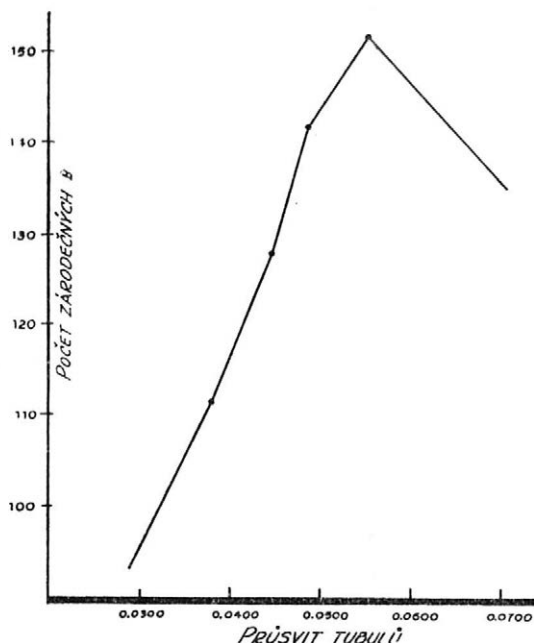


U tloušťky stěny a množství výskytu spermií jsme zřetelnou závislost nezaznamenali (obr. 5). Ve srovnání se stejnými měřeními u mladých býčků jsou to výsledky opačné.

S velikostí průsvitu nadvarletního vývodu stoupá výška epitelu a u zvlášť velkých lumen (0,4558) také síla stěny vývodu (obr. 6), což souhlasí s podobnými poměry u rostoucích zvířat. Rovněž tak je zřetelná závislost výšky epitelu na síle stěny nadvarletního vývodu (obr. 7).

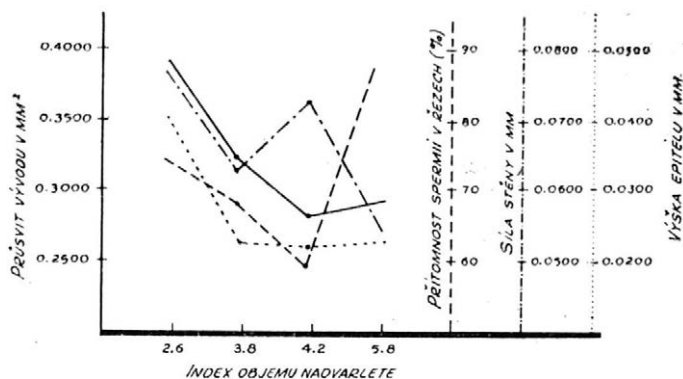


3. Vztah mezi váhou varlat, průsvitem tubulů a množstvím zárodečných buněk (býci brahman)



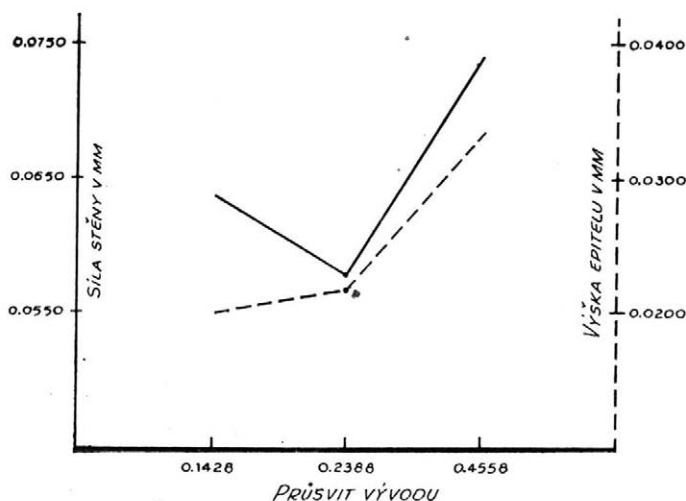
4. Vztah mezi průsvitem tubulů a množstvím zárodečných buněk (býci brahman)

5. Vztah mezi objemem nadvarlete, množstvím spermií ve vývodu nadvarlete, silou stěny vývodu nadvarlete, výškou epitelu a průsvitem vývodu nadvarlete (býci brahman)

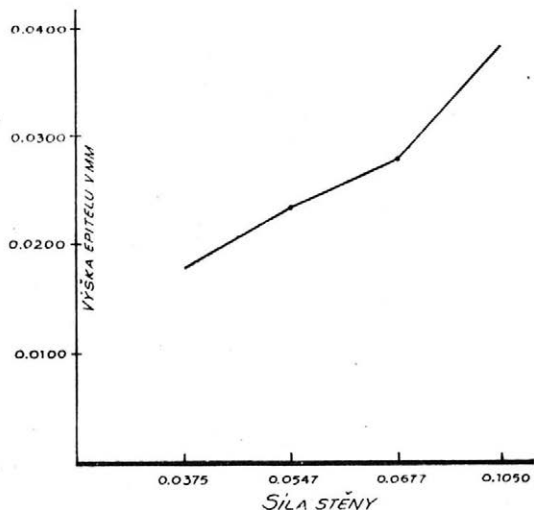


6. Vztah mezi průsvitem vývodu nadvarletního, silou jeho stěny a výškou epitelu

— síla stěny  
--- výška epitelu

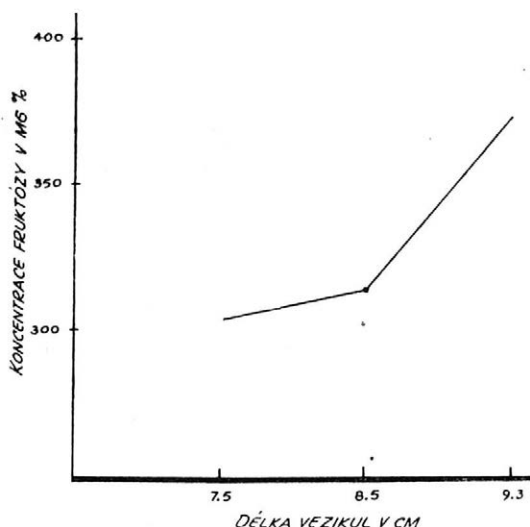


7. Vztah mezi silou stěny vývodu a výškou epitelu (býci brahman)



Z obr. 8 vyplývá, že s růstem vezikul stoupá v jejich sekretu i koncentrace fruktózy.

V tabulce V jsou zachyceny hodnoty ejakulátů několika málo plemenů zebu, získané v jednotlivých měsících. Těmto býkům se ejakuláty nesnadno odebírají, o čemž svědčí vysoké procento skoků, při nichž došlo k ejakulaci mimo



8. Vztah mezi velikostí vezikul semenných a koncentrací fruktózy v nich (býč Brahman)

umělou pochvu. Z 89 skoků se podařilo zachytit pouze 75 ejakulátů. Z tabulky V je patrné, že množství získaného spermatu bylo po celý rok přibližně stejné a podobně i výskyt patologicky změněných spermií. Rozdíly jsou však v motilitě a denzitě spermatu — v období měsíců března a dubna celkem u 21 ejakulátu bylo zjištěno 65 % progresivně pohyblivých spermií o koncentraci 1010 milionů v 1 ml, zatímco průměrná pohyblivost v ostatních měsících roku byla 87 % a koncentrace 1590 milionů spermií v 1 ml spermatu. Plodnost těchto plemenů se podařilo zachytit pouze za měsíc března, duben, květen a červen 1967, a to od 442 inseminovaných plemenic (holštýnských). Z těchto kusých výsledků vyplývá značně nižší březost po první inseminaci v měsíci březnu a dubnu oproti květnu a červnu. Totéž se jeví u všech ostatních inseminací s výjimkou června, který je stejný jako květen.

Porovnáme-li údaje biometricko-morfologické a fyziologické s údaji meteorologickými, uvedenými na obr. 9 a 10, vidíme, že nejnižší ukazatelé fertility býků zebu spadaly do období nejnižších srážek a do největšího nedostatku potravy všeobecně. V našich případech se však jednalo o vyrovnanou výživu všech zkoumaných zvířat po celý rok. Jde tedy pravděpodobně o faktory dědičné, nesnadno ovlivnitelné chovnými podmínkami.

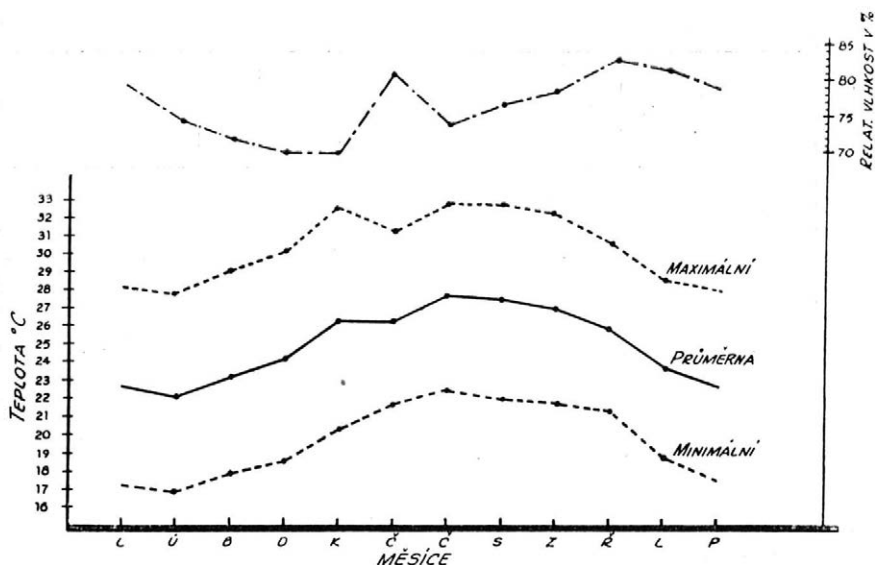
## DISKUSE A ZÁVĚR

Posoudíme-li výsledky sezónních šetření pohlavních funkcí brahmanských býků, vidíme, že ukazatelé plodnosti, jako je světlost tubulů, množství zárodečných buněk v nich, výška epitelu ve vývodu nadvarletním, velikost váčků semen-

## V. Plodnost během roku (býci zebu)

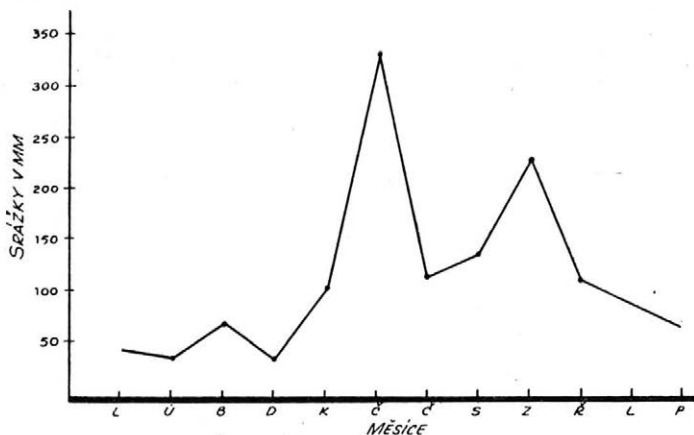
| Měsíc  | Počet<br>býků | Počet<br>ejaku-<br>látů | Objem<br>ejaku-<br>látu | Moti-<br>lita<br>v % | Den-<br>zita<br>v tis. | %<br>spermii<br>normál-<br>ních | % spermii patologických |               |       |                       |       |                          | Plodnost v %          |                               |
|--------|---------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------|-------|-----------------------|-------|--------------------------|-----------------------|-------------------------------|
|        |               |                         |                         |                      |                        |                                 | celkem                  | hlavič-<br>ka | krček | spoj-<br>vací<br>část | bičík | sekun-<br>dární<br>formy | po 1. in-<br>seminaci | po všech<br>insemi-<br>nacích |
| I.     | 2             | 8                       | 3,7                     | 86                   | 1455                   |                                 | 15                      | 60            | 15    | 5                     | 20    |                          |                       |                               |
| II.    | 2             | 7                       | 3,9                     | 88                   | 1600                   |                                 |                         |               |       |                       |       |                          |                       |                               |
| III.   | 4             | 14                      | 4,0                     | 68                   | 920                    | 83                              | 17                      | 20            | 29    | 12                    | 24    | 3                        | 56,0                  | 44,5                          |
| IV.    | 3             | 7                       | 3,1                     | 63                   | 1100                   | 80                              | 20                      | 25            | 22    | 9                     | 25    | 4                        | 59,0                  | 53,8                          |
| V.     | 3             | 9                       | 4,6                     | 84                   | 1440                   | 72                              | 28                      | 42            | 18    | 5                     | 24    | 3                        | 88,6                  | 70,2                          |
| VI.    | 3             | 4                       | 5,2                     | 88                   | 1690                   | 89                              | 11                      | 7             | 5     | 3                     | —     | 1                        | 73,5                  | 54,2                          |
| VII.   | 3             | 6                       | 4,0                     | 87                   | 1870                   | 83                              | 17                      | 36            | 8     | 17                    | 23    | 2                        |                       |                               |
| VIII.  | 4             | 6                       | 3,6                     | 86                   | 1420                   | 68                              | 32                      | 79            | 3     | —                     | 14    | 3                        |                       |                               |
| IX.    | 1             | 6                       | 4,0                     | 85                   | 1430                   |                                 |                         |               |       |                       |       |                          |                       |                               |
| X.     | 1             | 1                       | 7,0                     | 90                   | 1900                   |                                 |                         |               |       |                       |       |                          |                       |                               |
| XI.    | 1             | 4                       | 4,0                     | 90                   | 1700                   |                                 |                         |               |       |                       |       |                          |                       |                               |
| XII.   | 1             | 3                       | 4,0                     | 88                   | 1400                   |                                 |                         |               |       |                       |       |                          |                       |                               |
| Průměr |               |                         | 4,2                     | 83                   | 1460                   | 77                              | 22                      |               |       |                       |       |                          |                       |                               |

ných, koncentrace fruktózy v nich, denzita a motilita spermatu, jakož i jeho plodnost, byli nejnižší v březnu a v dubnu. Jsou naprosto odlišné od výsledků, získaných u plemen *Bos taurus*, jejichž plodnost je ovlivněna (zvláště v tropickém podnebí) teplotou vzduchu, popřípadě i délkou světelného dne. Totéž platí i o jiných druzích domácích zvířat. Žádný z uvedených klimatických činitelů se



9. Průměrné měsíční teploty a relativní vlhkosti v roce 1967

— — — — — měsíční teploty  
 — — — — — relativní vlhkost



10. Průměrné měsíční srážky v roce 1967

zřejmě plodnosti brahmanských býků nedotýká. Rozhodující je faktor srážek, a tím i úroveň výživy. Tito oba činitelé jsou nejnižší na jaře, přibližně v březnu a v dubnu, a zdají se být tak generačně vlivní, že ani zlepšené podmínky chovu a výživy nedokáží potlačit jejich tlumivé působení na fertilitu. Srovnáme-li naše výsledky s pozorováními Roye (1959 — cit. Maule 1962), konanými na

indických buvolích, vidíme souvislost v těchto ukazatelích: Roy zjistil, že v době od 11. února do 15. dubna (označované v Indii jako jaro) byla ve srovnání s ostatními obdobími roku sice naměřena nejvyšší hustota spermií, avšak nejnižší pohyblivost a nejnižší index fruktolýzy. Nejnižší procento abnormálních spermií zjistil, stejně jako my, v srpnu a v září.

Je tedy nutné u býků amerického zebu, chovaných v tropickém pásmu, počítat s poklesem plodnosti během měsíce března a dubna, a to jak v přirozené plemenitbě, tak v inseminaci. Je proto třeba omezit exploataci plemeníků v tomto období a pokud se sperma zmrazuje, dbát na jeho opatrné a pečlivé hodnocení.

## Literatura

- BHATNAGAR D. S., MUKHERJEE D. P., BHATTACHARYA P., 1955, Seasonal changes in the histology of the thyroid and testis of buffalo. *Indian. J. Vet. Sci.* 25 : 293-300.
- BONADONNA T., 1963, Fattori ambientali e ciclicità stagionale della fertilità animale. *Vet. ital.* 14, 9 : 967.
- CUPPS P. T., MCGOWAN B., RAHLMANN D. F., REDDON A. R., WEIR W. C., 1960, Seasonal changes in the semen of rams. *J. Anim. Sci.* 19 : 208-213.
- ČERMÁK O., 1970, Strukturální vývoj pohlavních žláz býčků zebu a F<sub>1</sub> během růstu. Sborník Vysoké školy zemědělské, Brno (v tisku).
- DIMITROPULOS E., 1968, Variations saisonnières de la fécondité chez les bovins. VI. Congr. Reprod. and Insem. Artif., Paris.
- ERB R. E., ANDREWS F. N., HILTON J. H., 1942, *J. Dairy Sci.* 25 : 815.
- HAFEZ E. S. E., 1962, Reproduction in Farm Animals Philadelphia.
- HAFEZ E. S. E., BONADONNA T., 1958, The effect of place of origin on the seasonal variation in semen production in Friesian bulls. *Zootec. e Vet.* 13 : 281-298.
- HULTNÄS C. A., STRÖM B., 1968, Study on seasonal variation in bull fertility. VI. Congr. Reprod. and Insem. Artif., Paris.
- JASKOWSKI L., WALKOWSKI L., 1960, Observations on the deep freezing of bull semen. *Roczn. Nauk. E.* 70 : 372-375.
- JOHNSTON J. E., BRANTON C., 1953, Effects of seasonal climatic changes on certain physiological reactions, semen production and fertility of dairy bulls. *J. Dairy Sci.* 36 : 934-942.
- KUSHWAHA N. S., MUKHERJEE D. P., BHATTACHARYA P., 1955, Seasonal variations in reaction time and semen qualities of buffalo-bulls. *Indian J. vet. Sci.* 25 : 317-328.
- MAKABAYASHI N. T., SALISBURY G. W., 1956, Variation observed in the aerobic fructolysis of semen. *Proc. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod.* Cambridge 1 : 28.
- MAULE J. P., 1962, The semen of animals and artificial insemination. Commonwealth Agricultural Bureaux.
- MERCIER E., SALISBURY G. W., 1947, Seasonal variations in hours of daylight associated with fertility level of cattle under natural breeding conditions. *J. Dairy Sci.* 30 : 747-756.
- MILIČEVIĆ D., VARADIN M., BORJANOVIĆ S., 1968, Certaines observations sur l'influence de la température de l'ambiance sur la qualité du sperme et la fertilité des taureaux. VI. Congr. Reprod. and Insem. Artif., Paris.
- MORGAN R. F., DAVIS H. P., 1968, Nebraska Univ. Agr. Expt. Sta. Research Bull. 104.
- MÜLLER R., HÖHN E. Z., 1954, Tierzücht. Züchtungsbiologie 64 : 91.
- OLOUFA M. M., SAYED A. A., BADRELDIN A. L., 1959, Seasonal variations in reaction time of Egyptian buffalo-bulls and physiochemical characteristics of their semen. *Indian. J. Dairy Sci.* 12 : 10-17.
- ORTAVANT R., 1958, Le Cycle Spermatogénétique chez le Bélier. Thesis, University of Paris, France.
- ORTAVANT R., 1962, Spermiogenetic response of the ram to varying light periods. *Proc. 4th. Int. Congr. Anim. Reprod.* (The Hague) 11 : 236-242.
- PHILLIPS R. W., McMENZIE F. F., 1934, Missouri Univ. Agr. Expt. Sta. Bull. 217.
- SCHINCKEL P. G., 1954, Australian Vet. J. 30 : 189.



- SCHINDLER H., 1954, Bull. Research Council Israel 4 : 184.  
 SCHMIDT K., 1954, Monatsch. Veterinärmed. 9 : 349.  
 SCHULTZE A. B., DAVIS H. H., BLUM C. T., OLOUFA M. M., 1948, Nebraska Univ. Agr. Expt. Sta. Research Bull. 154.  
 SULLIVAN J. J., ELLIOT F. I., 1968, Season and Fertility in Artificial Insemination. VI. Congr. Reprod. and Ins. Artif., Paris.  
 WEETH J. J., HERMAN H. A., 1949, Missouri Univ. Agr. Expt. Sta. Research Bull. 447.

Došlo dne 14. 12. 1970

ЧЕРМАК О. (Среднее агро-техническое училище, Босковице, Чехословакия). Оценка некоторых воспроизводительных способностей быков американского зебу. Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 549-562, 1971.

На основе биометрических, гистологических и физиологических сравнений изучалась плодовитость быков американского зебу в тропических условиях Кубы. Их плодовитость можно сравнить с молочными как отечественными, так и импортированными породами. В отличие от последних, их плодовитость слабеет в весенние (март, апрель), а не в самые теплые месяцы. Этот факт считается признаком определенной породной примитивности: снижение плодовитости связано с периодом недостатка пищи и воды, и ее нельзя изменить даже улучшением условий содержания и питания.

плодовитость; биометрика; гистология; семенники; придаток семенников; спермиограмма; везикулы; фруктоза; климат; тропическая зона

ČERMÁK O. (Secondary agricultural school, Boskovice, Czechoslovakia). *Evaluation of Some Reproductive Properties of American Zebu Bulls*. Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 549-562, 1971.

On the basis of biometrical, histological and physiological observations the fertility of American zebu bulls was investigated in tropical conditions of Cuba. The level of fertility is comparable with both domestic and imported milk breeds. However, in contrast to these breeds the fertility level of Zebu bulls was sinking in spring months (March and April) and not in the warmest months. This fact is attributed to a certain breed primitiveness. The lowered fertility is namely connected with a period of lack of food and water and cannot be increased even by improved breeding and feeding conditions.

fertility; biometrics; histology; testicles; epididymis; spermiogram; vesicles; fructose; clima; tropical zone

ČERMÁK O. (Landwirtschaftliche technische Mittelschule, Boskovice, Tschechoslowakei). *Bewertung einiger Reproduktionseigenschaften amerikanischer Zebubullen*. Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 549-562, 1971.

Es wurden biometrische, histologische und physiologische Untersuchungen über die Fruchtbarkeit von Bullen des amerikanischen Zebu unter tropischen Bedingungen Kubas angestellt. Das Fruchtbarkeitsniveau ist mit den einheimischen als auch importierten Milchrassen vergleichbar, nur mit dem Unterschied, daß es in den Frühjahrsmonaten (März und April) und nicht in den wärmsten Sommermonaten herabsank. Diese Tatsache wird auf eine bestimmte Rassenprimitivität zurückgeführt. Die herabgesetzte Fertilität hängt nämlich mit der Nahrungs- und Wassermangelperiode zusammen und kann durch Verbesserung der Zucht- und Ernährungsbedingungen nicht behoben werden.

Fertilität; Biometrik; Histologie; Hoden; Nebenhoden; Spermiogramm; Samenbläschen; Fructose; Klima; tropische Zone

*Adresa autora:*

Doc. MVDr. O. Čermák, CSc., Střední zemědělská technická škola, Boskovice

# SÉROVÝ GONADOTROPÍN (PMSG) KRÍŽENCŮV KOBÝL MALÉHO PLEMENA — BIOLOGICKÉ A IMUNOLOGICKÉ VLASTNOSTI

J. Arendarčík, J. Halagan

Vysoká škola veterinárská, katedra porovnávacej fyziológie, Košice

---

ARENDAŘÍK J., HALAGAN J. Sérový gonadotropin (PMSG) křížencův kobyl malého plemena — biologické a imunologické vlastnosti. Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 563-570, 1971.

Získané a čiastočne purifikované antigény PMSG od hucula, norika a křížencův — hucul X norik X hafling X fjord — reagovali vytvorením výraznej precipitácie s antisérami PMSG-OSS a LH-equine — Calbiochem. Nereagovali s antisérami HCG (Praedyn) a LH-ovine-NIH. Imunologickým testom určená aktivita PMSG, použitím antigénov z křížencův a z hucula a norika, nevykazovala rozdiely líšiace sa od výsledkov dosiahnutých u malých koní a křížencův pomocou antigénov a antisér PMSG z veľkého plemena kobyl. Kříženci vykazujú nižšie hodnoty aktivity ako nekřížené kobyly. Zmiešané séra od hucula v 86.–161. dni po pripustení vykazujú aktivitu PMSG 8,2–12,9 m. j./1 ml séra, u norika v 53.–99. deň po pripustení 3,5–6,45 m. j./1 ml séra, kříženci v 108. až 161. dni po pripustení vykazujú nižšiu aktivitu PMSG ako 2 m. j./1 ml séra. Natívne sérum vykazuje signifikantne nižšiu aktivitu PMSG ako čiastočne purifikovaný extrakt. Huculské kobyly pri 6.–8. gravidite vykazovali osemnásobne nižšiu aktivitu PMSG ako mladé kobyly pri prvej gravidite (65 m. j./1 ml séra; 8,28 m. j./1 ml séra).

gonadotropíny; PMSG žrebných kobyl; malé plemeno koní; kříženci; imunologický test; imunoelektroforéza; Ouchterlonyho agarový precipitácia

---

O aktivite PMSG v krvi žrebných kobyl veľkého a malého plemena a křížencův sme už referovali (Arendarčík, Itze 1968, Arendarčík 1969). V príspevku študujeme vlastnosti gonadotropínov v sére žrebných kobyl hucula, norika a křížencův hucul X norik X hafling X fjord. Hlavnou otázkou práce je, ak pomocou získaných antigénov PMSG — křížencův bude možné previesť HIT reakciu; ak áno, aké sú potom rozdiely vo výsledkoch dosiahnutých touto metódou v porovnaní s výsledkami získanými u veľkých plemien kobyl.

## MATERIÁL A METÓDY

1. Antiséra PMSG — OSS — Organon a antisérum HCG (PRAEDYN SPOFA) boli získané imunizáciou králikov metódou podľa Moudgal a Li (1961). Titer získaných antisér AS — PMSG — OSS, AS — HCG — Praedyn, ako aj vzájomná reakcia týchto antisér s vhodnými antigénami PMSG a ich aktivita u kobyl plemena hucul, norik a křížencův bola prevedená biologickým testom na infantilných krysiach kmeňa Wistar.

2. Precipitačné reakcie u antisér a antigénov boli prevedené dvojitou agar-gélovou precipitáciou podľa Ouchterlonyho a mikroimuno elektroforézou podľa Grabara.

3. Titer získaných antisér bol vhodný na prevádzanie hemaglutinačného inhibičného testu (1 : 3200 a 1 : 6400). Príprava antisér a červených ovčích krviniek senzibilizovaných PMSG — OSS, 16 000 m. j., sa previedla metódou podľa Wida (1962, 1963). Imunologický test sa previedol podľa metódy Butta a kol. (1964).

4. Príprava antigénu PMSG od kobýl : hucul, norik a krížencov : hucul X X muráň, hucul X norik, hucul X hafling a hucul X fjord.

Extrakcia PMSG z krvi kobýl po pripustení sa previedla pri teplote 4 °C. Natívne sérum sa lyofilizovalo a previedol sa prepočet ml séra na mgr séra. Aktivita PMSG HIT reakciou sa zisťovala v jednotlivých vzorkách od kobýl pripustených na 43., 47., 104., 108. a 117. deň. V ďalších sa zisťovala aktivita zo zmiešaných vzoriek. Vzorky lyofilizovaného séra sa rozpustili príslušným množstvom destilovanej vody, roztok sa upravil pomocou 0,5 M kys. fosforečnej na pH 3,0 a takto sa uchoval v chladničke pri 4 °C po 30 minút. Vytvorený precipitát sa odstránil centrifugovaním a supernatant sa upravil pomocou 1 M NaOH na pH 4,5 a pridal sa 1 obj. chladného, absolútneho alkoholu. Táto zmes sa uchovala v chladničke pri 4 °C na 2 hodiny. Inaktívny precipitát sa odstránil centrifugovaním. Supernatant sa zmiešal s 2 obj. alkoholu a nechal v chladničke pri 4 °C po 12 hodín. Väčšia časť supernatantu sa odstráni dekantovaním a zvyšok sa centrifugoval 10 min pri 2000 r/min. Precipitát sa rozpustil vo fyziologickom roztoku a dialyzoval cez noc oproti destilovanej vode. Aktivita takto čiastočne purifikovaného PMSG bola určovaná biologickým testom na infantilných krysách zvýšením váhy vaječníkov (Moodbidri a kol. 1968).

#### 5. Biologické pokusy

Zvýšenie váhy materníc u infantilných krysách samíc kmeňa Wistar bolo vzaté ako index pre celkové gonadotropíny. Prvé podanie skúšaného materiálu sa previedlo popoludní v prvý deň. Nasledujúce dva dni sa podával materiál 2 X denne, predpoludním a popoludní. Pitva krýs bola prevedená na štvrtý deň ráno. FSH aktivita bola určená augmentačnou metódou Steelman — Pohleyovou.

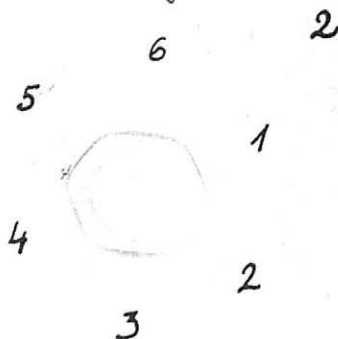
6. Výpočty aktivity získaných a čiastočne purifikovaných extraktov sa previedli podľa Apostolakis a Voigta (1965).

## VÝSLEDKY

1. Dvojitá agar-gélová difúzia podľa Ouchterlonyho ukázala, že všetky extrakty PMSG (hucul, norik a kríženci 1—4) reagovali s antisérom PMSG — OSS — ORGANON (obr. 1). Extrakty PMSG krížencov reagovali tiež s antisérom AS — LH — equine. Nereagovali s antisérom AS — HCG (Praedyn) a AS — LH — ovine — NIH (obr. 2). Mikroimuno elektroforézou zistené reakcie ukazujú, že všetky extrakty PMSG reagujú výrazne s antisérom PMSG — OSS (obr. 3—6).

2. Nakoľko antigény PMSG malých kobýl — hucula, norikov a krížencov — nevykázali pozitívne krížové reakcie s antisérom AS — HCG (Praedyn), použili sme biologický krížový pokus na krysách, ako je vyjadrený na tabuľkách I, II a III. Tab. I ukazuje, že antisérum AS — HCG inhibovalo asi 90 % aktivity PMSG. Extrakty krížencov vykázali pomerne slabý vplyv na váhu materníc.

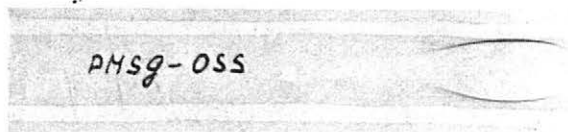
AS-PMSG-OSS



1. Ouchterlonyho agar-gélová precipitácia

V strede antisérum PMSG-OSS 0,15 ml, 1—6 čiastočne purifikovaný extrakt PMSG

1. PMSG z križenka Hucul × Muráň
2. PMSG z križenka Hucul × Norik
3. PMSG z križenka Hucul × Hafling
4. PMSG z križenka Hucul × Fjord
5. PMSG z Norika
6. PMSG z Hucula



2. Mikroimunoelektroforéza

V strede PMSG-OSS 1 mg, kanáliky AS-PMSG-OSS 0,18 ml, 1 $\frac{1}{2}$  hod., 12 mA



3. Mikroimunoelektroforéza

V strede extrakt PMSG 2 — Hucul × Norik 4,8 m. j., kanáliky 0,18 ml AS-PMSG-OSS, 1 hod., 12 mA



4. Mikroimunoelektroforéza

V strede extrakt PMSG 4, Hucul × Fjord 12 m. j., kanáliky 0,18 ml AS-PMSG-OSS 1 $\frac{1}{2}$  hod., 12 mA

Extr. 5

5. Mikroimunoelektroforéza

V strede 6 m. j. extraktu PMSG 5 Norik, kanáliky 0,18 ml OSS 1½ hod., 12 mA

Extr. 6

6. Mikroimunoelektroforéza

V strede 6 m. j. extraktu PMSG 6-Hucul, kanáliky 0,18 ml AS-PMSG-OSS  
1½ hod., 12 mA

I. Účinok antiséra HCG a PMSG na biologickú aktivitu PMSG malého plemena a krížencov, zisťovaný metódou prírastku váhy materníc intaktných krýs (celkové gonadotropíny)

| Skupina | Pohlavie krýs | Počet krýs | Pokusný materiál m. j. (ml)/1 krysa                 | Váha materníc mg/100 g ž. v. |
|---------|---------------|------------|-----------------------------------------------------|------------------------------|
| 1       | samice        | 6          | —                                                   | 124 ± 9,67                   |
| 2       | samice        | 5          | NKS 0,5 ml                                          | 121 ± 6,25                   |
| 3       | samice        | 5          | PMSG 1 6 m. j.                                      | 146 ± 12,50                  |
| 4       | samice        | 5          | PMSG 2 6 m. j.                                      | 125 ± 23,60                  |
| 5       | samice        | 5          | PMSG 3 6 m. j.                                      | 126 ± 7,90                   |
| 6       | samice        | 5          | PMSG 4 6 m. j.                                      | 119 ± 9,20                   |
| 7       | samice        | 5          | PMSG N 5 6 m. j.                                    | 159 ± 3,30                   |
| 8       | samice        | 5          | PMSG H 6 6 m. j.                                    | 144 ± 1,65                   |
| 9       | samice        | 5          | PMSG-OSS-ORG 6 m. j.                                | 160 ± 3,70                   |
| 10      | samice        | 5          | PMSG-OSS-ORG 6 m. j.<br>+ AS-PMSG-OSS-ORG<br>0,5 ml | 107 ± 4,66                   |
| 11      | samice        | 5          | PMSG-OSS-ORG 6 m. j.<br>+ AS-HCG 0,5 ml             | 134 ± 4,76                   |

Križenci: PMSG 1 = Hucul × Muráň  
PMSG 2 = Hucul × Norik  
PMSG 3 = Hucul × Hafling  
PMSG 4 = Hucul × Fjord  
PMSG 5 = Norik  
PMSG 6 = Hucul  
AS = antisérum  
NKS = normálne králičie sérum

Naproti tomu hucul a norik vykazuje zvýšenú aktivitu. Tab. II ukazuje výrazný účinok aktivity HCG na biologickú aktivitu PMSG hucula, norika a krížencov hucul × norik. Križenci vykazujú nižšie hodnoty ako nekrížené kobyly. Antisérum HCG znižuje aktivitu PMSG u všetkých skupín zvierat. Tab. III ukazuje, že aktivita LH v extraktoch PMSG nie je vždy rovnako neutralizovaná antisérom HCG. Antisérum PMSG — OSS vykazuje konštantný účinok v potláčaní aktivity LH.

3. Hemaglutinačným inhibičným testom sa zistila aktivita PMSG v krvi pripustených kobýl: hucul, norik a krížencov takto:

a) hucul: 11 kobýl, 11—17 r, 71 žriebät, 33♂ a 38♀, vo zmiešaných vzorkách krvi medzi 86.—140. dňom po pripustení vykázali aktivitu PMSG 8,28 m. j./1 ml séra;

b) norik: 3 kobyly, 4—11 r., 21 žriebät, 10♂ a 11♀. Zmiešané vzorky od 53.—91. dňa po pripustení, aktivita PMSG 7,56 m. j./1 ml séra;

c) kríženci: hucul × muráň, 3 kobyly, 1—13 r., 13 žriebät, 7♂, 6♀, zmiešané vzorky 107.—124. deň po pripustení, aktivita PMSG 6,12 m. j./1 ml séra;

d) hucul × fjord, 3 kobyly, 4—6 r, 1 × ožrebené, 1♂, 1♀, zmiešané vzorky 133.—161. deň po pripustení, aktivita PMSG 6,48 m. j./1 ml séra;

e) hucul × norik, 5 kobýl, 5—8 r, 4 žriebätá, 2♂, 2♀, zmiešané vzorky 108.—145. deň po pripustení 7,2 m. j./1 ml séra;

II. Účinnok HCG antiséra na biologickú aktivitu PMSG Mucula, Norika a krížencov Hucul X Norik, zisťovaný HCG augmentačnou metódou

| Skupina | Pohlavie krýs | Počet krýs | Pokusný materiál m. j. (ml)/1 krysa | Váha vaječníkov mg/100 g ž. v. |
|---------|---------------|------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1       | samice        | 6          | —                                   | 69 ± 2,53                      |
| 2       | samice        | 5          | HCG 30 m. j.                        | 116 ± 8,14                     |
| 3       | samice        | 5          | PMSG 2 6 m. j.                      | 83 ± 13,73                     |
| 4       | samice        | 5          | PMSG 2 6 m. j. + NKS 3,5            | 91 ± 6,50                      |
| 5       | samice        | 5          | PMSG H 6 6 m. j. + NKS 0 5          | 83 ± 3,65                      |
| 6       | samice        | 5          | PMSG N 5 6 m. j. + NKS 0 5          | 109 ± 3,78                     |
| 7       | samice        | 5          | PMSG 2 6 m. j. + HCG 30 m. j.       | 98 ± 7,63                      |
| 8       | samice        | 5          | PMSG H 6 6 m. j. + HCG 30 m. j.     | 120 ± 6,95                     |
| 9       | samice        | 5          | PMSG N 5 6 m. j. + HCG 30 m. j.     | 121 ± 10,11                    |
| 10      | samice        | 6          | —                                   | 53,2 ± 0,825                   |
| 11      | samice        | 5          | PMSG 2 6 m. j. + AS-HG 0 5          | 52 ± 1,80                      |
| 12      | samice        | 5          | PMSG H 6 6 m. j. + AS-HCG 0 5       | 50,4 ± 1,15                    |
| 13      | samice        | 5          | PMSG N 5 6 m. j. + AS-HCG 0 5       | 54,7 ± 1,15                    |

Križenci: PMSG 2 = Hucul × Norik  
PMSG N 5 = Norik  
PMSG H 6 = Hucul  
AS = antisérum  
NKS = normálne králičie sérum

f) hucul X hafling, 7 kobýl, 5–6 r., 6 žriebät, 3♂ a 3♀, aktivita PMSG zo zmiešaných vzoriek od 75.—160. dňa po pripustení 7,2 m. j./1 ml séra.

Potrebné je pripomenúť, že aktivita PMSG závisí aj od doby odberu vzoriek so zreteľom na peak aktivity.

## DISKUSIA

Ouchterlonyho dvojitou agar-gélovou precipitáciou a mikroimunoelektroforézou sa ukázalo, že použité antigény a antiséra sú dostatočne aktívne pre neutralizáciu aktivity PMSG malých koní a krížencov v pokusoch na krysách. Získané extrakty PMSG, čiastočne purifikované, vytvárali s antisérom PMSG — OSS a antisérom LH-equine výrazné precipitačné reakcie. Žiadne precipitačné reakcie nevznikli s antisérom HCG a LH ovine. Krížový biologický pokus na krysách naproti tomu, medzi antigénami PMSG a HCG, ukázal signifikantné potlačenie aktivity antigénu PMSG po podaní HCG a opačne. Mikroimunoelektroforézou sa potvrdzuje dostatočná aktivita a solidná čistota získaných antigénov PMSG



II. Účinnok HCG antiséra na biologickú aktivitu PMSG Hucula, Norika a krížencov v pokuse na ventr. prostate infantilných krysih samcov

| Skupina | Pohlavie krys | Počet krys | Pokusný materiál m. j. (ml)/1 krysa | Váha ventr. prostaty mg/100 g ž. v. |
|---------|---------------|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1       | samci         | 6          | —                                   | 62 ± 2,88                           |
| 2       | samci         | 5          | NKS 0 5                             | 67 ± 1,35                           |
| 3       | samci         | 5          | PMSG-OSS-ORG 6 m. j.                | 108 ± 8,10                          |
| 4       | samci         | 5          | PMSG 1 6 m. j.                      | 66 ± 2,20                           |
| 5       | samci         | 5          | PMSG H 6 6 m. j.                    | 85 ± 4,70                           |
| 6       | samci         | 5          | PMSG N 5 6 m. j.                    | 87 ± 4,40                           |
| 7       | samci         | 5          | PMSG 2 6 m. j.                      | 87 ± 10,35                          |
| 8       | samci         | 5          | PMSG 4 6 m. j.<br>+ NKS 0 5         | 90,1 ± 6,50                         |
| 9       | samci         | 5          | PMSG H 6 6 m. j.<br>+ NKS 0 5       | 69 ± 1,35                           |
| 10      | samci         | 6          | —                                   | 54,1 ± 1,75                         |
| 11      | samci         | 5          | PMSG N 5 6 m. j.<br>+ NKS 0 5       | 56,0 ± 3,17                         |
| 12      | samci         | 5          | PMSG OSS, 6 m. j.<br>+ AS HCG 0 5   | 67,5 ± 1,87                         |
| 13      | samci         | 5          | PMSG H 6 6 m. j.<br>+ AS HCG 0 5    | 75,8 ± 1,43                         |
| 14      | samci         | 5          | PMSG 2 6 m. j.<br>+ AS HCG 0 5      | 71,9 ± 2,12                         |
| 15      | samci         | 5          | PMSG H 6 6 m. j.<br>+ AS PMSG 0 5   | 55,7 ± 1,68                         |
| 16      | samci         | 5          | AS-HCG 0 5                          | 57,2 ± 2,40                         |
| 17      | samci         | 5          | AS-PMSG 0 5                         | 59,2 ± 2,70                         |

PMSG 1 = kríženci Hucul × Muráň

PMSG 2 = kríženci Hucul × Norik

PMSG 4 = kríženci Hucul × Fjord

PMSG N 5 = Norik

PMSG H 6 = Hucul

AS = antisérum

NKS = normálne králičie sérum

malých kobýl a krížencov. Pri sledovaní hlavnej myšlienky práce sa zistilo, že aktivita PMSG kobýl malého plemena a krížencov odpovedá zisteniam, ktoré sme uviedli v predchádzajúcej práci (Arendarčík 1969). Na porovnanie v 43. dni a v 108. dni po pripustení, ako aj zmiešané vzorky v rôznych časových intervaloch, vykazuje hucul vždy vyššiu aktivitu PMSG/1 ml séra ako kríženci. Pri porovnaní aktivity PMSG v sére a extrakte, v sére bola spravidla nižšia aktivita a u krížencov vždy nižšia ako u nekrížených kobýl. Pri štúdiu týchto otázok je potrebné rešpektovať plemeno kobýl, vek, počet ožrebení, počet žriebät a ich pohlavie. Z doterajších štúdií je známe, že malé plemená vykazujú nižšiu aktivitu PMSG ako veľké plemená kobýl, pričom vek (Rowlands

1963) nie je v súvislosti s aktivitou. Žrebnosť niekoľkokrát po sebe nasledujúca znižuje postupne aktivitu PMSG. U poníkov v priebehu piatich rokov poklesla aktivita z 12,400 m. j. pri prvej žrebnosti na 3,371 m. j. po piatej žrebnosti. V našom prípade huculské kobyly pri prvej gravidite vykazovali peak aktivity pri 65,2 m. j./1 ml séra, po šiestej až osmej gravidite poklesla aktivita PMSG na 8,28 m. j./1 ml séra. Zmysel poklesu aktivity po každej žrebnosti sa ťažko dá vysvetliť. Zdá sa, že ľahšie sa dá vysvetliť zvýšená produkcia PMSG u kobýl s dvojčatami. Vysvetľuje sa to zvýšeným množstvom pohárkovitých buniek v endometriu, produkujúcich PMSG. Pohárkovité bunky sa zmnožia práve v tých miestach, kde sa prichytávajú zárodky. Hybridizácia, ako sme uviedli v predchádzajúcej práci, znižuje aktivitu PMSG. Nakoniec možno podľa dosiahnutých výsledkov uviesť, že malé plemená koní a krížence vykazujú isté rozdiely v imunologických a biologických reakciách v porovnaní s veľkými plemenami koní. V podstate sú si druhovo rovnaké, čo ukazujú Ouchterlonyho precipitačné reakcie medzi antigénami PMSG krížencov a antisérom PMSG OSS veľkých kobýl a antisérom LH-equine (Calbiochem, Los Angeles). Imunologickým testom určené výsledky v predchádzajúcej a v teraz predkladanej práci ukazujú, že antigény PMSG kobýl malého plemena a krížencov nie sú odlišné od antigénov PMSG kobýl veľkého plemena z hľadiska biologického a imunologického.

Ďakujeme riaditeľovi Žrebčína na Muráni ing. Z. Topercerovi za pomoc a povolenie odberu krvi od koní.

## Literatúra

- APOSTOLAKIS M., VOIGT K. D., 1965, Gonadotropine. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 140 s.
- ARENDARČIK J., ITZE L., 1968, Estimation of pregnant mare serum gonadotropin with the aid of hemagglutination-inhibiting test. *Endocrinologia experimentalis* 2 : 54-56.
- ARENDARČIK J., 1969, Aktivita PMSG a ICSH (LH) v krvi koní malého plemena a ich krížencov, určená imunologickým testom (HIT). *Vet. Med. (Praha)* 14, 9 : 497-504.
- BUTT W. R., CROOKE A. C., CUNNINGHAM F. Y., INGRASSIA F., 1964, Immunological test for chorionic gonadotropin in pregnancy. *Proc. Roy. Soc. Med. Section of Obstetrics and Gynaecology* 57 : 851-854 (31-34).
- MOODBIDRI S. B., SHETH A. R., SHANTA S. R., 1968, Pregnant donkey serum gonadotropin. Part I. Purification and its biological and immunological properties. *Indian J. exp. Biol.* 6, 4 : 216-218.
- MOUDGAL N. R., CHOH HAO LI, 1961, An immunochemical study of sheep pituitary interstitial cell-stimulating hormone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95, 1 : 93-98.
- ROWLANDS I. W., 1963, Levels of gonadotropins in tissues and fluids with emphasis on domestic animals. In: *Gonadotropins, their chemical and biological properties and secretory control*, edited by H. H. Cole, W. H. Freeman and comp., San Francisco and London : 74-112.
- WIDE L., 1962, An immunological method for the assay of human chorionic gonadotropin. *Acta Endocrinologica (Kbh.) Suppl.* 70 : 41.
- WIDE M., WIDE L., 1963, Diagnosis of pregnancy in mares by an immunological method. *Nature* 198 : 1017-1018.

Došlo dne 20. 1. 1971

АРЕНДАРЧИК Й., ХАЛАГАН Й. (Ветеринарный институт, кафедра сравнительной физиологии, Кошице, Чехословакия). Сывороточный гонадотропин (PMSG) помесей кобыл малой породы — биологические и иммунологические свойства. *Vet. Med. (Praha)* 16 (9) : 563-570, 1971.

Полученные и частично очищенные антигены PMSG от гуцула, норика и помесей — гуцул X норик X гафлинг X фьорд реагировали образованием явной преципитацией с антисыворотками PMSG-OSS и LH-equine-Calbiochem. Не реагировали с антисыворотками HCG (Praedyn) и LH-ovine-NIH. При помощи иммунологического теста определяемая активность PMSG, с применением антигенов из помесей и из гуцула и норика, не отличалась от результатов, полученных у малых лошадей и помесей при помощи антигенов и антисывороток PMSG из крупной породы кобыл. Помеси показывают более низкие значения активности, чем чистопородные кобыли. Смешанная сыворотка от гуцула в 86—161 день после случки показывает активность PMSG 8,2—12,9 м. е./1 мл сыворотки, у норика в 53—99 день после случки 3,5—6,45 м. е./1 мл сыворотки, помеси в 108—161 день после случки показывают активность PMSG менее 2 м. е./1 мл сыворотки. Нativная сыворотка имеет достоверно более низкую активность PMSG, чем частично очищенный экстракт. Гуцульские кобыли при 6—8 беременности имели в 8 раз меньшую активность PMSG, чем молодые кобыли при первой беременности (65 м. е./1 мл сыворотки; 8,28 м. е./1 мл сыворотки).

гонадотропины; PMSG жеребых кобыл; малая порода лошадей; помеси; иммунологический тест; иммуноэлектрофорез; Оухтерлона агар — гель преципитации

ARENDAŘČÍK J., HALAGAN J. (University of Veterinary Medicine, Department of Comparative Physiology, Košice, Czechoslovakia). *Serum Gonadotropine (PMSG) in the Crossbreds of the Mares of the Small Breed*. *Vet. Med. (Praha)* 16 (9) : 563-570, 1971.

The partially purified PMSG antigens obtained from the Guzul and Noric horses, and from crossbreds — Guzul X Noric X Hafling X Fjord responded by considerable precipitation with antisera PMSG-OSS and LH-equine — Calbiochem. They did not show any reaction with antisera HCG (Praedyn) and LH-ovine-NIH. The activity of PMSG determined by the immunological test and by means of the antigens from the crossbreds of the Guzul and Noric horses did not show differences other than the values obtained in small horses and crossbreds by means of antigens and antisera PMSG from large horse breeds. The crossbreds show lower values of activity than the uncrossed mares. The mixed sera from the Guzul show PMSG activity 8.2—12.9 i. u. per 1 ml of serum on the 86<sup>th</sup>—121<sup>st</sup> day after mating; the values for the PMSG activity in the Noric horse are 3.5—6.45 i. u. per 1 ml of serum on the 53<sup>rd</sup>—99<sup>th</sup> day after mating; in the crossbreds the PMSG activity is lower than 2 i. u. per 1 ml of serum on the 108<sup>th</sup>—161<sup>st</sup> day after mating. The native serum shows significantly smaller activity of PMSG than the purified extract. The Guzul mares being in the 6<sup>th</sup>—8<sup>th</sup> gravidity showed PMSG activity 8 times lower than young mares in first gravidity (65 i. u. per 1 ml of serum; 8.28 i. u. per 1 ml of serum).

gonadotropines; PMSG of pregnant mares; small horse breed; crossbreds; immunological test; immunoelectrophoresis; Ouchterlony's agar-gel precipitation

ARENDAŘČÍK J., HALAGAN J. Veterinärhochschule, Košice, Tschechoslowakei). *Serumgonadotropin (PMSG) der Kreuzungsprodukte von Kleinpferdstuten*. *Vet. Med. (Praha)* 16 (9) : 563-570, 1971.

Die vom Huzule (Panjepferd), Noriker und den Kreuzungsprodukten — Huzule — Noriker X Haflinger X Fjordpferd gewonnenen und teilweise purifizierten PMSG-Antigene reagierten mit den Antiseren PMSG-OSS und LH-Equine — Calbiochem durch die Bildung einer ausgeprägten Präzipitation. Mit Antiseren HCG (Praedyn) und LH-Ovine-NIH reagierten sie nicht. Die mit der Benützung der Antigene von Kreuzungsprodukten und vom Huzule und Noriker im immunologischen Test bestimmte PMSG-Aktivität wies keine sich von den mittels PMSG-Antigene und Antiseren von den Großpferdstuten gewonnenen Ergebnissen unterscheidenden Differenzen auf. Kreuzungsprodukte weisen niedrigere Aktivitätswerte als ungekreuzte Stuten auf. Gemischte Seren vom Huzule weisen am 86.—161. Tage nach der Deckung

eine PMSG-Aktivität von 8,2–12,9 I. E./1 ml Serum auf, beim Noriker am 53.–99. Tag nach der Deckung von 3,5–6,45 I. E./1 ml Serum, Kreuzungsprodukte weisen am 108.–161. Tage nach der Deckung eine niedrigere PMSG-Aktivität als 2 I. E./1 ml Serum auf. Das native Serum weist eine signifikant niedrigere PMSG-Aktivität als der teilweise purifizierte Extrakt auf. Bei der 6.–8. Gravidität wiesen Huzuler Stuten eine 8mal niedrigere PMSG-Aktivität als junge Stuten bei der ersten Gravidität (65 I. E./1 ml Serum; 8,28 I. E./1 ml Serum) auf.

Gonadotropine; PMSG der trächtigen Stuten; Kleinpferderasse; Kreuzungsprodukte; immunologischer Test; Immunoelktrophorese; Ouchterlony Agar-Gelpräzipitation

---

*Adresa autorov:*

Prof. MVDr. J. Arendarčík, DrSc., MVDr. J. Halagan, Vysoká škola veterinárska, Košice, Komenského 71

---

# NEURÁLNÍ KOMPLIKACE PO PREVENTIVNÍM OČKOVÁNÍ BEAGLŮ PROTI VZTEKLINĚ

E. Řehulová, I. Sýkora

Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii Praha — pobočka Rosice nad Labem

---

ŘEHULOVÁ E., SÝKORA I. *Neurální komplikace po preventivním očkování beaglů proti vzteklině*. Vet. Med. (Praha) 16 (9): 571-574, 1971.

Popsali jsme klinický i histopatologický obraz postvakcinační disseminované meningoencefalomyelitidy po jednorázovém preventivním očkování beaglů Fleury-LEP vakcínou proti vzteklině. Onemocnění může vést k úhynu zvířete už v časně fázi oedemem mozku nebo může vyústit i v těžké ložiskové změny při delším trvání choroby. Onemocnělo celkem pět psů z počtu 73 očkovaných, v žádném případě onemocněla fena, jichž bylo 36. Tři z pěti postižených psů se spontánně uzdravili.

Fleury-LEP vakcína; disseminovaná meningoencefalomyelitida; klinika; histopatologie; křeče; oedem mozku; myelomalacie; úhyn; spontánní uzdravení

---

K profylaktickému očkování proti vzteklině byla v dřívější době užívána vakcína vyrobená z mozkové tkáně ovcí, kterým byl intracerebrálně aplikován *virus fixus*. V humánní medicíně se dosud užívá výhradně Hemptovy vakcíny tohoto typu. Imunita vznikající po její aplikaci trvá asi jeden rok. Ve veterinární praxi však byly zaznamenány dosti četné případy nervových komplikací v souvislosti s působením vakcíny a ojedinělé případy byly pozorovány i v humánní medicíně.

Psi se v současné době u nás i v zahraničí preventivně očkují proti vzteklině tzv. Fleury-LEP vakcínou. Je vyrobená z kuřecích embryí a obsahuje živý virus vztekliny, mitigovaný opakovaným mnohonásobným pasážováním na kuřecích embryích (30–40 low egg passage). Získané imunita trvá asi dva roky. Neurální komplikace po aplikaci této tzv. avianizované vakcíny nejsou u nás v běžné veterinární praxi uváděny, a proto si dovoluujeme předložit své zkušenosti.

## MATERIÁL A VÝSLEDKY

V našem chovu byli v době od 7. do 31. ledna 1969 očkovaní celkem 73 psi ve věku 6 měsíců Fleury-LEP vakcínou jednorázově proti vzteklině. U pěti psů se objevily v druhém až třetím týdnu po vakcinaci nepravdělné drobné svalové záškuby na končetinách nebo i na obličejové části hlavy, později parézy končetin různého rozsahu.

U dvou psů příznaky po několika málo týdnech spontánně vymizely, psi se jevíli jako zdraví, a proto byli zařazeni do pokusů. Za šest až osm měsíců od aplikace vakcíny nebyly při histopatologickém vyšetření mozku a míchy, které

proběhlo současně s vyšetřováním tkáně při závěru chronické toxické studie látky, v mozku ani v míše nalezeny chorobné změny. Jeden pes přežívá s přetrvávající zcela lehkou paraparézou pánevních končetin. Svalové záškuby se u něho už neobjevují. Dva psi uhynuli. U jednoho z nich se už pátý den po vakcinaci objevily nepravidelné záškuby končetin, pes postupně ochaboval, upadl do bezvědomí a 15. den uhynul. Makroskopický pitevní nález byl celkem chudý a histopatologické vyšetření ukázalo kromě oedemu mozku nepříliš početné perivaskulární zánětlivé infiltráty v řezech z pontu a z bederní míchy. Příčinou smrti byla pravděpodobně komprese prodloužené míchy při oedemu mozku. Druhý pes uhynul ve čtvrtém týdnu po aplikaci vakcíny, když se původní paréza pánevních končetin vystupňovala v těžkou paraplegii s kachexií a celkovou ochablostí. U tohoto psa jsme našli už plně rozvinutý patologicko-anatomický obraz onemocnění.

Psa jsme pitvali do 12 hodin po uhynutí. Po odklopení kalvy byla nalezena bledá, jemná, lesklá, snad jen lehce napjatá tvrdá plena, měkké pleny byly bez patologického nálezu. Po otevření kanálu páteřního prosvítala modře tvrdá plena jen v nevelkém rozsahu v krajině krční páteře. Mozek i mícha byly fixovány *in toto* v 10% solném roztoku formolu. Na vnitřních orgánech dutiny břišní a hrudní nebyly nalezeny pozoruhodné patologické změny.

Při histopatologickém vyšetření dominuje obraz disseminované meningoencefalomyelitidy, která postihuje hlavně zadní mozek a hřbetní míchu. Jsou tu rozsáhlé plášťovité perivaskulární kulatobuněčné infiltráty, zvláště v bílé hmotě, ale přítomné v menším rozsahu i v šedé hmotě, kde se nacházejí kromě toho i drobné haemorrhagie a plazmorhagie. Mikroglie je zmnožená, místy i uzlíčkovitě. Některé gangliové buňky jeví mírné regresivní změny. Nález je výrazný ve všech oddílech míchy, je prokazatelný i v pontu, mozeček je nejméně postižen. V řezech z lumbální části míchy jsme našli kromě toho rozsáhlé ložisko malatické, postihující poněkud asymetricky přední provazce a přední rohy míšní. V řezu je zastižena i výrazně změněná céva. Její stěna je mohutně zánětlivě infiltrovaná a endotelie jsou zduřelé. Ve zmrazeném řezu, který je poněkud vzdálen centru tohoto ložiska, je při barvení na tuk ol. červení prokazatelná úklidová reakce.

## DISKUSE A ZÁVĚR

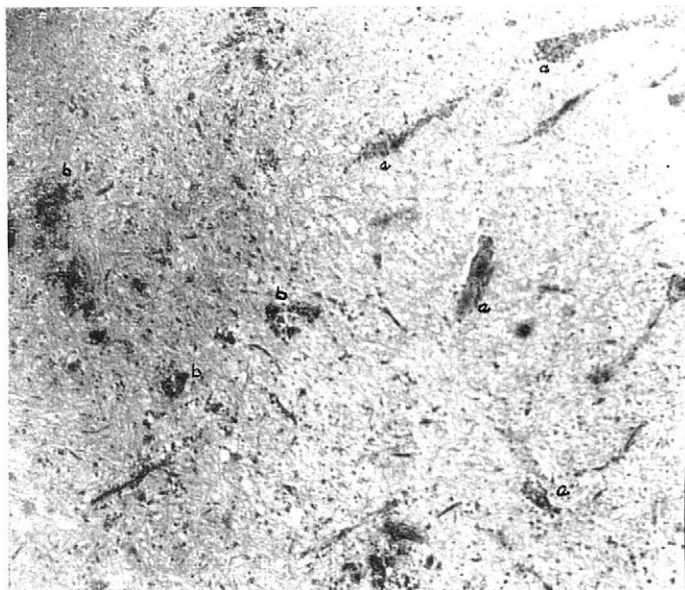
Srovnáme-li svá pozorování a nálezy s výsledky Potelovy práce (1958), který pokusně aplikoval Fleury-LEP vakcínu deseti psům, jde o obdobný obraz. Na rozdíl od tohoto autora, který popsal maximum změn v pontu a v mozečku, pozorovali jsme v našich případech maximum změn v pontu a ve spinální míše. Regresivní změny na gangliových buňkách byly méně výrazné, to lze však vysvětlit tím, že oba naši psi uhynuli do čtyř týdnů po vakcinaci, kdežto Potel našel tyto změny až v pátém týdnu po vakcinaci. Inkubační doba — konec prvního týdne až druhý týden po vakcinaci — je shodná i v našich případech.

Histopatologicky je obraz charakteristický pro encefaliditu postvakcinační, jak jsou popisovány v humánní patologii. V popředí u nich stojí plášťovité perivaskulární infiltráty, převážně kulatobuněčné, v bílé hmotě. Současné postižení šedé hmoty je uváděno v obrazech tzv. parainfekčních encefalitid a skupiny virových panencefalitid a podle Palaskeho (1955) také samotné lyssy. Vezmeme-li v úvahu, že součástí Fleury-LEP vakcíny je mitigovaný živý virus, bylo by snad možné vysvětlit změny v centrálním nervovém systému jednak



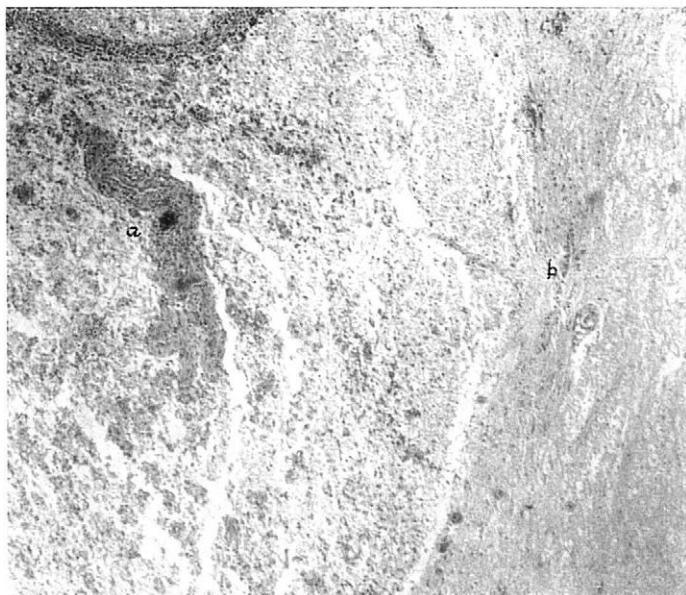


1. Křehčí mýcha. Oedem a zmnožení mikroglie v bílé hmotě, kulatobuněčné infiltráty perivaskulárně (a) a v měkkých plenách (b). HE, zv. 65 X



2. Hrudní mícha. Kulatobuněčné perivaskulární infiltráty v bílé hmotě (a), drobné haemorrhagie a plasmorrhagie v šedé hmotě (b). HE, zvětš. 65 X





3. Bederní mícha. Myelomalatické ložisko se zánětlivě změněnou cévou (a), zúžený *canalis centralis* míchy (b). HE, zvětšeno 65X

lokální alergickou reakcí, jednak i přímým účinkem samotného viru. Negriho tělíska se nám nepodařilo prokázat, stejně jako jiným autorům.

Individuální dispozice očkovaných psů pro vznik onemocnění se tu jistě uplatňuje. V Potelově pokusné skupině onemocněli čtyři psi z deseti, tj. 40 %, v naší sérii očkovaných psů onemocnělo pět psů ze 73, tj. 6,8 %. Potelovi uhynuli tři psi, v našem chovu uhynuli po vakcinaci dva psi. V naší sérii v žádném případě onemocněla fena, kterých bylo očkováno celkem 36. V Potelově práci údaj o poměrném poškození pohlaví chybí.

## Literatura

HINTERMANN J., 1966, Schw. Arch. f. Tierheilkunde 108 : 591-597.

LACKERMEIER S., 1966, Schw. Arch. f. Tierheilkunde 108 : 581-590.

PALASKE G., 1955, Pathologische Histologie. Jena.

POTEL M., 1958, Arch. Exp. Vet. Med. 12 : 612-626.

—, 1963, Pathologická anatomie. Díl II., část 2. Praha.

Došlo dne 20. 7. 1970

---

Э. РЖЕГУЛОВА, И. СИКОРА (НИИ фармацевтики и биохимии, Прага — филиал Рошице н/Лаб., Чехословакия.) Нейральные осложнения вследствие профилактической прививки биглов против бешенства. Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 571-574.

Мы описали клиническую и гистопатологическую картину послевакцинального рассеянного менингоэнцефаломиелита, полученного вследствие одноразовой профилактической прививки биглов Fleury-LEP вакциной против бешенства. Заболевание может привести к гибели животного уже в ранней фазе из-за отека мозга или же к тяжелым локальным изменениям, если заболевание затяжное. Из 73 привитых собак заболело 5, но ни в одном случае не заболела сука, которых было 36. Три из пяти заболевших собак выздоровили спонтанно.

вакцина Fleury-LEP; рассеянный менингоэнцефаломиелит; клиника; гистопатология; плазма; отек мозга; размягчение спинного мозга; гибель; спонтанное выздоровление

E. ŘEHULOVÁ, I. SÝKORA (Research Institute for Pharmacy and Biochemistry, Prague, Station Rosice nad Labem, Czechoslovakia). *Neural Complications after Preventive Vaccination of Beagles against Rabies*. Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 571-574, 1971.

There is a description of the clinical and histopathological picture of post-vaccination disseminated meningoencephalomyelitis after a single-batch preventive vaccination of Beagles with the Fleury-LEP anti-rabies vaccine. The disease may lead to the death of the animal already at an early stage of cerebral oedema or may even result in severe deposit changes in longer duration of the disease. The total number of dogs vaccinated was 73; five of these were diseased. In none of the cases the disease was contracted by a female (there were 36 bitches). Three of the diseased dogs spontaneously recovered.

Fleury-LEP antirabies vaccine; disseminated meningoencephalomyelitis; clinic; histopathology; spasms; cerebral oedema; myelomalacia; spontaneous recovery

E. ŘEHULOVÁ, I. SÝKORA (Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie Praha — Zweigstelle Rosice n. Lab., Tschechoslowakei). *Neurale Komplikation nach einer präventiven Impfung der Beagles gegen Tollwut*. Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 571-574, 1971.

Wir haben das klinische sowie histopathologische Bild der disseminierten post-vakzinalen Meningoenzephalomyelitis nach einer einmaligen präventiven Impfung der Beagles mit der Fleury-LEP Vakzine gegen Tollwut beschrieben. Die Krankheit kann zu einem Verenden des Tieres bereits in der frühen Phase durch Gehirnödem führen oder kann auch, falls die Krankheit eine längere Zeit dauert, schwere Herdänderungen verursachen. Von der Anzahl der 73 geimpften Hunde sind insgesamt 5 Hunde erkrankt, in keinem einzigen Falle ist eine Hündin, von denen es 36 waren, erkrankt. Drei von den fünf befallenen Hunden genasen spontan.

Fleury-LEP Vakzine; disseminierte Meningoenzephalomyelitis; Klinik; Histopathologie; Krämpfe; Gehirnödem; Myelomalazie; Verenden; spontane Genesung

---

*Adresa autorů:*

MUDr. E. Řehulová, RNDr. I. Sýkora, CSc., Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, pobočka Rosice n. Labem

---

# VLIV pH PROSTŘEDÍ A NĚKTERÝCH SLOUČENIN KOVŮ NA ENZYMATICKOU AKTIVITU ROSTLINNÉ UREÁZY

O. Zapletal

Vysoká škola veterinární, ústav chemie a toxikologie, Brno

O. ZAPLETAL *Vliv pH prostředí a některých sloučenin kovů na enzymatickou aktivitu rostlinné ureázy.* Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 575-582, 1971.

V pokusech *in vitro* byla sledována a ověřována možnost, jak ovlivnit ureolytickou aktivitu rostlinné ureázy některými fyzikálními a chemickými faktory. Především jsme sledovali závislost enzymatické aktivity ureázy na hodnotě pH prostředí, potom inhibiční účinnost sloučenin některých kovů, a to dusičnanu stříbrného, síranu měďnatého, síranu železnatého, chloridu železitého a hexakynoželeznanu draselného, použitých v roztocích o koncentraci 0,01 M, 0,001 M a 0,0001 M. Výsledky z těchto experimentů ukazují, že rostlinná ureáza vykazuje nejvyšší ureolytickou aktivitu v prostředí o pH 7,2–8,0. Vysoký inhibiční účinek byl zjištěn u dusičnanu stříbrného a síranu měďnatého; menší inhibiční účinek byl zjištěn při použití síranu železnatého a chloridu železitého. Při použití hexakynoželeznanu draselného byl zaznamenán inhibiční účinek jen velmi nízký.

ureáza; enzymatická aktivita; ovlivnění; fyzikální faktory; pH; chemické faktory; inhibice

Při zkrmování močoviny přežvýkavcům dochází mnohdy k uvolňování většího množství amoniaku v bacheru, které není bacherová mikroflóra schopna metabolicky využít. Tento stav může vyvolat prudké toxické stavy, což potvrzují práce Lewis (1960), Solnceva a kol. (1963) aj. Tito autoři shodně udávají, že anorganický dusík může být při přeměně v mikrobiální aminokyseliny a bílkoviny neefektivněji využit jen tehdy, je-li ekvivalent proteínu v přijaté potravě nižší než ekvivalent škrobu. Ovšem kromě tohoto principiálního předpokladu však nelze opomenout vlastní enzymatickou aktivitu mikroorganismů přítomných v bacheru, u nichž, jak uvádí Schulken (1961) a řada jiných autorů, dochází k převodu přijaté močoviny v amoniak. Podobný význam mají i v bacherovém obsahu přítomné látky rostlinného původu, jež vykazují rovněž určitou enzymatickou ureolytickou aktivitu, jako jsou např. sója, sójové pokrutiny, melounová jádra apod. (Neuman a kol. 1965). Právě ureolytická aktivita obou těchto složek představuje za určitých podmínek nebezpečí, že v bacheru může dojít v krátké době k hydrolytickému uvolnění nadměrného množství amoniaku. Z tohoto uvolněného amoniaku je jen část metabolicky využita mikroorganismy zažívad. Druhá část využita není, ať už pro nízký počet přítomných mikroorganismů, nebo pro jejich neschopnost amoniak zpracovat při nedostatku energetických zdrojů v přijaté potravě. Pak je tato část amoniaku již sliznicí bacheru, popřípadě dalších částí zažívacího traktu, přímo resorbována (Lewis 1960, Boďa a kol. 1958 aj.) a může se stát příčinou vzniku intoxikace amoniakem (Warren 1962, Bartík a kol. 1966, Rosival

1968). Enzymem ureázou, podmiňujícím tento proces štěpení močoviny, a jejími vlastnostmi se zabýval S u m n e r (1926), který prokázal, že jedna z krystalických bílkovin připravených extrakcí ze sójových bobů má enzymatické, specificky ureolytické vlastnosti. Podobná zjištění, spojená s určením základních fyzikálních a chemických dat o tomto enzymu, uvádí i řada dalších autorů. P e t t e r s o n a kol. (1948) sledoval vliv koncentrace tohoto enzymu na jeho specifickou aktivitu a stanovil jeho Michaelisovu konstantu. H o w e l l a kol. (1934) sledoval vliv optimálního prostředí na aktivitu tohoto enzymu a zjistil (podle charakteru použitého tlumiče) optimální pH v rozmezí 6,4–7,6. K r i s h n a B a h a d u r a kol. (1959) zjistil toto optimum při pH 8,8, S t r a u b (1962) je udává v rozmezí hodnot pH 6,4–6,9.

Enzymatická ureázová aktivita byla rovněž shledána v bachorovém obsahu přežvýkavců, ve stěně žaludku zvířat jak polygastrických, tak i monogastrických, jakož i v některých tělních orgánech.

D a v i s a kol. (1956), L e w i s (1960) a S o l n c e v a kol. (1963) udávají, že ureázová aktivita v předžaludecích přežvýkavců je z větší části původu mikrobiálního, v případě zkrmování rostlin či krmiv obsahujících ureázu je i původu rostlinného. Tito autoři zjistili rovněž některé podmínky pro její optimální aktivitu. Jako optimální bylo zjištěno rozmezí hodnot pH 6,4–7,2 při teplotě 37–39 °C, což obojí jsou hodnoty charakteristické pro obsah bachoru za podmínek fyziologických.

Rovněž byla sledována možnost inhibičně ovlivnit tento enzym. Vliv specifických i nespecifických inhibitorů na aktivitu ureázy a roli SH skupin enzymu sledoval S m y t h e (1936), který zjistil, že je-li jodacetamidem vázáno 27 až 30 % SH skupin enzymu, dojde k jeho inhibici. H e l l e r m a n a kol. (1934) rovněž potvrdil, že blokováním SH skupiny dochází k inhibici ureázy. Podobně P e t t e r s o n a kol. (1948) udává, že pokud je ureáza se substrátem inkubována v prostředí prostém H<sub>2</sub>S nebo cysteinu, snižuje záhy svoji aktivitu. Tento autor se rovněž zabýval studiem vlivu některých nespecifických inhibitorů na ureázu. Zjistil, že iont stříbrný má výraznou inaktivační účinnost vůči tomuto enzymu. Vliv sloučenin mědi na aktivitu enzymů zjistil B e r n h e i m (1940), na aktivitu ureázy pak W a l k e r (1964), jenž dosáhl úplného zastavení ureolýzy v bachoru přidáním 4 ml 2 % roztoku CuSO<sub>4</sub> do 15 ml *in vitro* inkubovaného vzorku. Podobně i J o h n s o n a kol. (1962) dosáhl podstatné inhibice ureázové aktivity jak u čisté ureázy, tak také u bachorové šťávy nízkými dávkami CuSO<sub>4</sub>, podávanými v rozmezí 0,1–1,0 % inkubovaného vzorku.

Podobné výsledky, dosažené s kyselinou acetoxyhydroxamovou, uvádějí K o b a s h i a kol. (1962) a B a i t n e r (1964). Tito autoři zjistili, že uvedená sloučenina vykazuje značný inhibiční účinek vůči ureáze, i když podle K o b a s h i a kol. (1962) je inhibice omezena hodnotou pH prostředí, neboť probíhá jen při pH 7–10.

Cílem vlastní práce bylo ověřit v pokusech *in vitro* s čistou rostlinnou ureázou vliv hodnoty pH na aktivitu tohoto enzymu, spolu s možností využití některých solí kovů, jako dusičnanu stříbrného, síranu měďnatého, síranu železnatého, chloridu železitého a hexakyanoželeznatanu draselného k jeho inhibici.

## MATERIÁL A METODA

Enzymatická aktivita ureázy byla sledována na čisté ureáze rostlinného původu, preparátu C. Erba-Milano. Prostředí, v němž aktivita tohoto enzymu byla sledována, bylo ustáleno fosfátovými tlumiči podle S ø r e n s e n a (K e i l

a kol. 1959), při čtyřech různých hodnotách pH. Dva tlumiče byly zvoleny pro hodnotu nižší než pH 7 a dva pro hodnotu vyšší.

Ureáza byla vysušena v exsikátoru nad pevným hydroxidem draselným a silikagelem do konstantní váhy a v tomto stavu byla stále udržována k jednotlivým pokusům.

Jako substrát byl připraven standardní roztok močoviny *p. a.*, v koncentraci 1 molární. 1 ml roztoku obsahoval 60,06 mg urey, tj. 28,016 mg dusíku. Tento roztok, připravený za sterilních podmínek, byl vždy kontrolován podle Čs. lékopisu na přítomnost volného amoniaku, chloridů a síranů a byl uchováván v chladničce při teplotě 3 °C.

Vzorky pro inkubaci byly připravovány bezprostředně před experimentem a k inkubaci a přípravě vzorků bylo používáno zkumavek a pipet sterilizovaných v horkovzdušném sterilizátoru. Byly použity zkumavky o rozměrech 175 × 20 mm se zabroušenou zátkou. Substrát byl odměřován mikropipetou pro objem 0,1 ml.

**Příprava vzorku.** Do sterilizované zkumavky se zabroušenou zátkou bylo naváženo 5 mg vysušeného práškového enzymu, přidáno 4,4 ml příslušného tlumiče a 0,5 ml deionizované vody. Obsah byl promísen jemným krouživým pohybem a zkumavka vložena do vodní lázně 37 °C teplé na pět minut. Potom bylo přidáno 0,1 ml substrátu a vzorek ve zkumavce uzavřen zátkou. Od okamžiku, kdy byl přidán substrát do suspenze ureázy v tlumiči, byl odečítán čas hydrolýzy. Vzorek byl inkubován celkem 40 minut a po tuto dobu byl obsah zkumavky mísen stálým mírným kyvem zkumavek. Během inkubace byly v intervalech 10, 20 a 40 minut odebírány z inkubované směsi mikropipetou vzorky o objemu 0,2 ml a okamžitě přeneseny do mikrodifúzní nádoby z parafínu, kde Conwayovou mikrodifúzní metodou (K e i l a kol. 1959) bylo stanoveno množství uvolněného dusíku močoviny.

Vzorky připravené uvedeným postupem byly doplněny o slepé vzorky A a B.

Složení slepého vzorku A:

- 5,0 mg enzymu,
- 4,4 ml tlumiče,
- 0,6 ml deionizované vody.

Složení slepého vzorku B:

- 4,4 ml tlumiče,
- 0,5 ml deionizované vody,
- 0,1 ml 1 M roztoku substrátu.

Pro jedno stanovení enzymatické aktivity ureázy bylo vždy připraveno šest vzorků, a to s tlumiči pro pH 5,7, 6,3, 7,2, 8,0, slepý vzorek A a slepý vzorek B. Každá tato sestava byla připravena a zpracována ve dvaceti provedeních.

Pro studium inhibičního účinku vybraných sloučenin kovů byly pokusné vzorky připraveny tak, že místo 0,5 ml deionizované vody bylo do inkubované směsi přidáno 0,5 ml roztoku příslušné sloučeniny kovu. Tyto roztoky byly připraveny ze sloučenin:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{AgNO}_3$ ;  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , vždy v koncentracích 0,01 M, 0,001 M, 0,0001 M.

Pro pokusy s inhibicí aktivity ureázy byly ještě připraveny další dva slepé vzorky C a D.

Složení slepého vzorku C:

- 5,0 mg ureázy,
- 4,4 ml tlumiče,
- 0,5 ml roztoku inhibitoru,
- 0,1 ml deionizované vody.

Složení slepého vzorku D:

4,4 ml tlumiče,

0,5 ml roztoku inhibitoru,

0,1 ml 1 M roztoku močoviny jako substrátu.

Tyto slepé vzorky byly inkubovány a zpracovány za stejných podmínek jako vzorky experimentální. Všechny byly inkubovány opět při teplotě 37 °C a v intervalu 10, 20 a 40 minut bylo odebráno 0,2 ml inkubované směsi.

Výsledky pokusů byly pak vyhodnocovány podle následující úvahy. V 5 ml inkubované směsi bylo obsaženo 0,1 ml 1 M roztoku močoviny, což představuje 2,8016 mg N močoviny. Toto množství močoviny bylo enzymaticky štěpeno 5 mg suchého enzymu. 1 mg enzymu bylo štěpeno tedy 1,201 mg urey a mohlo být uvolněno 0,5603 mg N močoviny. Všechny získané výsledky byly pak přepočítávány na 1 mg suchého enzymu.

## VÝSLEDKY

Výsledky studia závislosti enzymatické aktivity ureázy na hodnotě pH prostředí, v němž byla inkubována spolu s 1 M roztokem močoviny, při stálých podmínkách objemových, teplotních a časových, jsou procentuálně vyjádřeny v tab. I. Absolutní hodnoty v přepočtu na mg N močoviny, uvolněné 1 mg suchého enzymu, jsou vyjádřeny na obr. 1.

I. Závislost enzymatické aktivity ureázy na hodnotě pH prostředí

| pH  | Čas v minutách |       |       |
|-----|----------------|-------|-------|
|     | 10             | 20    | 40    |
|     | % urey         |       |       |
| 5,7 | 1,93           | 3,14  | 4,12  |
| 6,3 | 3,25           | 4,77  | 6,02  |
| 7,2 | 7,83           | 16,16 | 22,03 |
| 8,0 | 13,14          | 21,82 | 33,08 |

Nejvyšší ureolytická aktivita tohoto enzymu byla zjištěna při hodnotách pH > 7.

Výsledky experimentálního ovlivnění enzymatické aktivity ureázy roztoky síranu měďnatého, síranu železitého, chloridu železitého, dusičnanu stříbrného a hexakynoželeznanu draselného, použitými v koncentracích 0,01, 0,001 a 0,0001 M, jsou uvedeny na obr. 2 a 3.

Z charakteru hodnot získaných v experimentech je patrna skutečnost, že pokud jsou vzorky inkubovány

v prostředí, jehož pH je nižší než 7, je enzymatická aktivita ureázy natolik nízká, že inaktivační efekt sledovaných sloučenin kovů se neprojevil jejím výraznějším omezením.

## DISKUSE

Podle získaných údajů je možné říci, že aktivita ureázy je především ovlivněna hodnotou pH inkubovaného prostředí. V našem experimentu jako optimální bylo zjištěno pH > 7. Srovnáním těchto údajů s údaji Howella a kol. (1934) a Strauba (1962), kteří uvádějí hodnoty pH posunuté směrem ke sféře kyselé, tj. pH 6,4–7,6 a pH 6,4–6,9, vyplývá, že výsledky získané v našich experimentech se pohybují ve sféře neutrální až mírně alkalické. Kyselé prostředí se ukázalo jako nevhodné pro činnost tohoto enzymu.

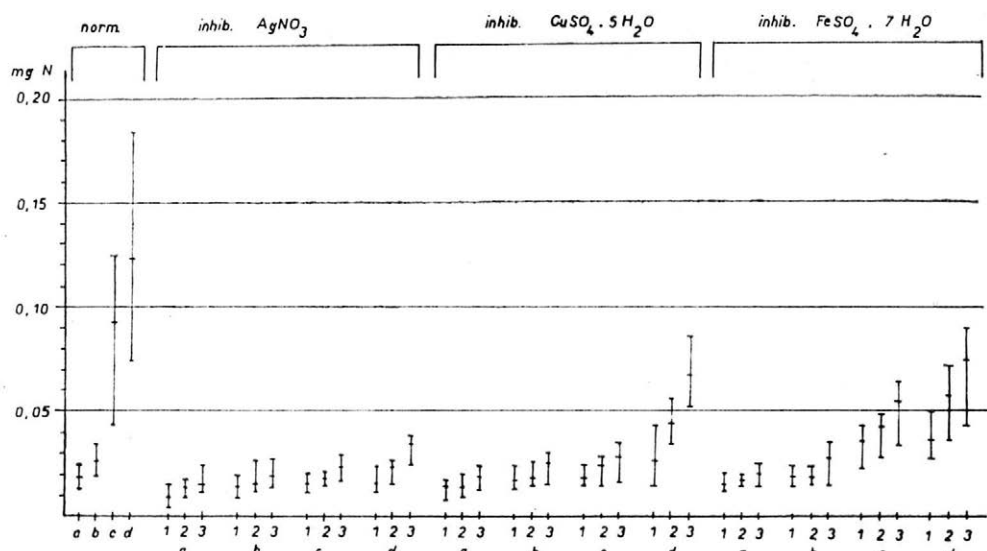
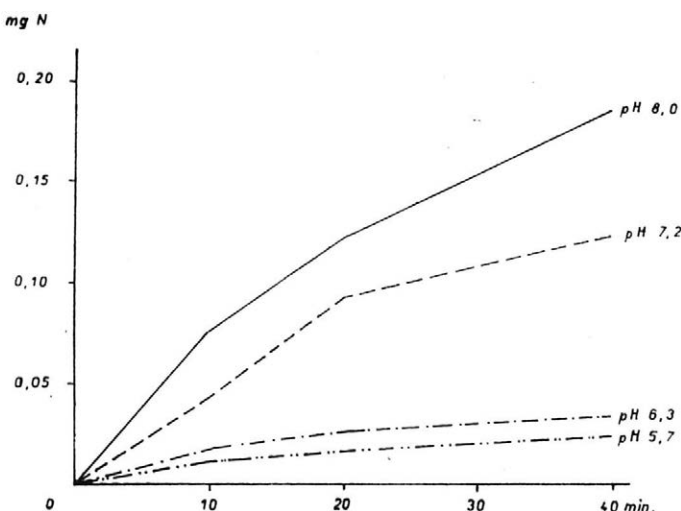
Studiem inhibičního účinku uvedených sloučenin kovů vůči rostlinné



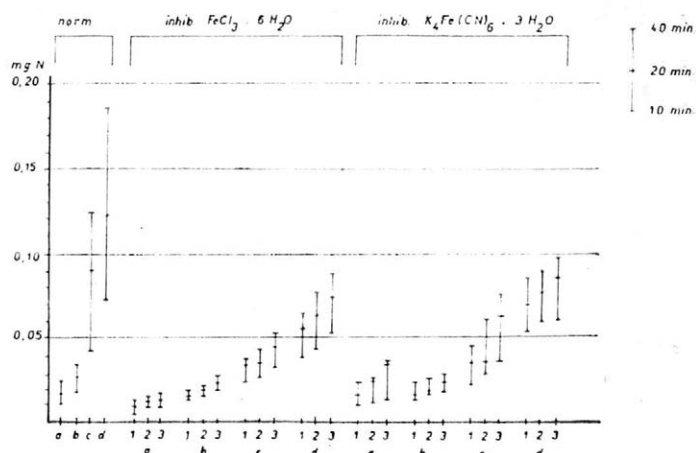
ureáze bylo zjištěno, že se nejvýrazněji projevil u roztoků dusičnanu stříbrného, síranu měďnatého, síranu železnatého a chloridu železitého, zatímco inhibiční účinek roztoku hexakynoželeznatanu draselného byl nevýrazný. Rozdíl lze objasnit tím, že v prvních čtyřech použitých sloučeninách můžeme uvažovat o tom, že se jedná o nespecifickou inaktivační účinnost přímo iontů  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Tato inaktivační účinnost má charakter inhibice nekompetitivní, enzym je inhibován vazbou těchto iontů na kteroukoliv funkční skupinu své bílkovinné molekuly (Pettersen a kol. 1948, Bernheim 1940).

Nelze však vyloučit ani druhou možnost, zvláště u iontů  $\text{Cu}^{2+}$ , které mohou působit při katalytické oxidaci i SH skupin ureázy, probíhající za přítomnosti

# 1. Aktivita ureázy při rozdílném pH prostředí



# 2. Aktivita ureázy, ovlivněná účinkem roztoků dusičnanu stříbrného, síranu měďnatého a síranu železnatého, při různém pH prostředí



3. Aktivita ureázy ovlivněná účinkem roztoků chloridu železitého a hexakynoželesnatanu draselného, při různém pH prostředí

- 1 0,01 M inhibitor
- 2 0,001 M inhibitor
- 3 0,0001 M inhibitor
- a pH 5,7
- b pH 6,3
- c pH 7,2
- d pH 8,0

atmosférického kyslíku. Tento způsob inhibice, jak zjistil Bernheim (1940), je inhibicí kompetitivní.

Proti tomu — v případě zjištěného velmi nízkého inhibičního účinku roztoku hexakynoželesnatanu draselného — je možné vidět příčinu tohoto jevu v tom, že dvojmocné železo, které v iontové formě vykazuje dosti značný inhibiční efekt vůči ureáze, je vázáno v komplexním aniontu hexakynoželesnatém ( $\text{Fe/CN}_6$ )<sup>4-</sup>. Podle Remyho (1962) a Votočka (1944) je železo v tomto komplexním aniontu velmi dobře maskováno. Jak uvádí Votoček (1944), železo v této formě není prokazatelné běžnými analytickými postupy; i z hlediska biologického lze v tomto případě říci, že proti železnatému kationtu, jenž je vůči ureáze inhibičně účinný, je forma komplexního aniontu hexakynoželesnatého vůči ureáze a její enzymatické aktivitě účinná již podstatně méně.

Srovnáním našich výsledků inhibice ureázy síranem měďnatým s výsledky, které uvádí Johnson a kol. (1962), vyplývá, že tato sloučenina vykazuje inhibiční účinek v koncentracích podstatně nižších, než zjistil tento autor. Zatímco v našich experimentech byl zjištěn účinek  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  již v koncentracích 0,01, 0,001 a 0,0001 M, podle Johnsona a kol. (1962) je tomu v koncentraci 0,1–1,0 %.

## Literatura

- BAITNER K., 1964, A karbamid mérgezés megelőzése acetohidroxamsavval. Állattenyésztés 13 : 373.
- BARTÍK M., ROSÍVAL I., 1966, Otravy prežúvavcov amoniakom, amonnými solami a močovinou. Veterinárství 16 : 446.
- BERNHEIM F., 1940, Note of the action of copper and phenylhydrazine on certain dehydrogenases. Journ. biol. chem. 133 : 485.
- BODA K., 1958 Stúdium niektorých N-metabolitov v krvi rožného statku. I. Močovina. Vet. Med. (Praha) 7 : 529–538.
- DAVIS C. L., LASSITER C. A., SEATH D. M., RUST J. W., 1956, An evaluation of urea and dicyandiamide for milking cows. J. Anim. Sci. 15 : 515.
- HELLERMAN L., PERKINS M. E., 1934, Activation of enzyme. II. Pepsin activity as influenced by oxidation-reduction and the action of metal compounds. Journ. Biol. Chem. 107 : 241.
- HOWELL S. F., SUMNER J. B., 1934, The specific effects of buffers upon urease activity. Journ. Biol. Chem. 104 : 619.

- JOHNSON R. R., BENTLEY O. G., HERSHBERGER T. V., 1962, The effectiveness of coated urea prills and copper treated urea prills as nitrogen sources for rumen microorganisms. Res. Bull. of Ohio Agric. Exp. Stat. : 917.
- KEIL B., ŠOROMOVÁ Z., 1959, Laboratorní technika biochemie. NČSAV Praha.
- KOBASHI KYOICHI, JUNICHI HASE, KIHACHIRO UEHARA, 1962, Specific inhibition of urease hydroxamic acids. Bioch. Biophys. Acta 65 : 380.
- KRISHNA BAHADUR, VISHNU CHANDRA, 1959, Abbau von Harnstoff durch Urease. Enzymologia 21 : 1. Cit. Chem. Z. Blatt 133 : 1646.
- LEWIS D., 1960, Ammonia toxicity in the ruminant. J. Agr. Sci. 55 : 111.
- NEUMAN V., ZAPLETAL O., 1965, Biochemické a toxikologické aspekty přikrmování přežvýkavců močovinou. Veterinářství 6 : 260.
- PETERSON J., HARMON K. M., NIEMANN C., 1948, The dependence of the specific activity of urease upon the apparent absolute enzyme concentration. Journ. Biol. Chem. 176 : 1.
- REMY H., 1962, Anorganická chemie, I., II. díl, SNTL Praha.
- ROSÍVAL I., 1968, Detoxikácia amoniaku. Vplyv iontomeniča na amoniakálnu intoxikáciu oviec po podaní močoviny. Kandidátska disertačná práca, Veterinárska fakulta VŠP Košice.
- SCHULKEN C., 1961, Untersuchungen über den Ammoniakgehalt des Pansensaftes beim Rind. Inaug. Dissert., Hannover.
- SMYTHE C. V., 1936, The reaction of iodoacetate and iodoacetamide with various sulfhydryl groups, with urease, and with yeast preparations. Journ. Biol. Chem. 114 : 601.
- SOLNCEV A. J., TICHINA N. A., BOBYLEV A. K., 1963, Obměn azotistých věšestv v rubce žvačných živočichů. Izv. Ak. Nauk SSSR 4 : 419.
- STRAUB F. B., 1962, Biochemie. NČSAV Praha.
- SUMMER J. E., 1962, The isolation and crystallization of the enzyme urease. Preliminary paper. Journ. Biol. Chem. 69 : 435.
- VOTOČEK E., 1944, Chemie anorganická. IV. vyd., Praha.
- WALKER K. D. J., 1964, The application of calorimetry to the study of ruminal fermentation in vitro. Austr. J. Agr. Res. 15 : 299.
- WARREN K., 1962, Ammonia toxicity and pH. Nature 195 : 47.

Došlo dne 5. 10. 1970

ZAPLETAL O. (Veterinárny institút, Brno, Československo). Vliv pH prostředí a některých sloučenin kovů na enzymatickou aktivitu rostlinné ureázy. Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 575-582, 1971.

V průběhu průběžných pokusů studovali a ověřovali možnost působení některých fyzikálních a chemických faktorů na ureolitickou aktivitu rostlinné ureázy. V první řadě zkoumali závislost enzymatické aktivity ureázy od kvality pH prostředí, a ve druhé — inhibiční působení sloučenin některých kovů, a zejména dusičanu stříbra, sulfátu mědi, sulfátu železa, chloridu železa a hexacyanoferritu draselného, použitých v roztocích v koncentracích 0,01 M, 0,001 M a 0,0001 M. Získané v těchto pokusech výsledky ukazují, že rostlinná ureáza má největší ureolitickou aktivitu v prostředí s pH 7,2–8,0. Vysoké inhibiční působení je doloženo u dusičanu stříbra a sulfátu mědi, a slabší u sulfátu železa a chloridu železa. Velmi slabé inhibiční působení je pozorováno při použití hexacyanoferritu draselného.

ureáza; enzymatická aktivita; působení; fyzikální faktory; pH; chemické faktory; inhibice

ZAPLETAL O. (University of Veterinary Medicine, Brno, Czechoslovakia). The Influence of the pH-Value of Environment and of Some Metal Compounds on the Enzymatic Activity of Plant Urease. Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 575-582, 1971.

The possibility of influencing the ureolytic activity of plant urease with some physical and chemical factors was investigated and verified in experiments carried out

*in vitro*. First the dependence of enzymatic activity of urease was investigated on the pH- value of environment and the inhibition effect of compounds of some metals, such as silver nitrate, cupric sulphate, ferrous sulphate, ferric chloride and potassium hexacyanoferrate, applied in solutions with the concentration of 0.01 M, 0.001 M, and 0.0001 M. The results obtained in these experiments indicate that the plant urease shows the highest ureolytic activity in an environment with the pH-value of 7.2–8. The high inhibition effect was ascertained in silver nitrate and cupric sulphate; the less inhibition effect was found with the application of ferrous sulphate and ferric chloride. With the application of potassium hexacyanoferrate, only a very low inhibition effect was recorded.

urease; enzymatic activity; influencing; physical factors; pH-value; chemical factors; inhibition

ZAPLETAL O. (Veterinärhochschule, Brno, Tschechoslowakei). *Einfluß des pH-Wertes des Milieus und einiger Metallverbindungen auf die enzymatische Aktivität der Pflanzenurease*. Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 575-582, 1971.

In Versuchen *in vitro* wurde die Möglichkeit der Beeinflussung der ureolytischen Aktivität der Pflanzenurease durch einige physikalische und chemische Faktoren untersucht und überprüft. In erster Reihe wurde die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Urease vom pH-Wert des Milieus festgestellt. In zweiter Reihe wurde die Inhibitionswirkung einiger Metallverbindungen, und zwar des Silbernitrats, des Kupfersulfats, des Eisensulfats, des Eisenchlorids und des Kalium-Hexacyanoferrats, die in Konzentrationen von 0,01 M, 0,001 M und 0,0001 M benutzt wurden, geprüft. Die in diesen Versuchen gewonnenen Resultate weisen darauf hin, daß die Pflanzenurease die höchste ureolytische Aktivität in einem Milieu mit 7,2–8,0 pH aufweist. Eine hohe Inhibitionswirkung wurde beim Silbernitrat und Kupfersulfat festgestellt. Geringer war die Wirkung Eisensulfats und Eisenchlorids. Die Inhibitionswirkung des Kalium-Hexacyanoferrats war nur sehr gering.

Urease; enzymatische Aktivität; Beeinflussung; physikalische Faktoren; pH; chemische Faktoren; Inhibition

---

Adresa autora:

MVDr. O. Zapletal, Vysoká škola veterinární, Brno, Palackého 1–3

---

D. Šimková, K. Boďa

Vysoká škola veterinárska, katedra patologickej morfológie a fyziológie, Košice

---

ŠIMKOVÁ D., BOĎA K. *Obsah tuku u myši po aplikácii aurothioglukózy.* Vet. Med. (Praha) 16 (9) : 583-587, 1971.

Aurothioglukóza vyvoláva u istého počtu dospelých myši obezitu, pričom táto sa nemusí u všetkých zvierat prejavíť zmenami vo váhe, ale prejaví sa len zvýšením celkového množstva tuku v priemere o 15 %, čo je v porovnaní s kontrolnými zvieratmi štatisticky významné ( $P < 0,001$ ).

aurothioglukóza; tuk

---

V hypotalame myši a krýs, ktorým bola aplikovaná aurothioglukóza, sa vytvárajú výrazné lézie pozostávajúce z neostroohraničených bledých ložísk s regresívnymi nekrobiotickými a degeneratívnymi zmenami gangliových buniek (Šimková a kol. 1967a, b). Tieto lézie majú potom u niektorých zvierat za následok obezitu (Mayer, Marshall 1965) a priemerná váha pokusných zvierat je v porovnaní so zvieratmi kontrolnými signifikantne vyššia (Šimková, Boďa — v tlači). Han a kol. (1965) udáva však podstatne vyššie percento tuku u krýs s hypotalamickými léziami, hoci priemerná váha tela obéznych zvierat nebola vyššia v porovnaní s kontrolami.

V našich pokusoch sme stanovili celkové množstvo tuku u dospelých myši po aplikácii aurothioglukózy a porovnali ho s celkovým množstvom tuku u kontrolných zvierat.

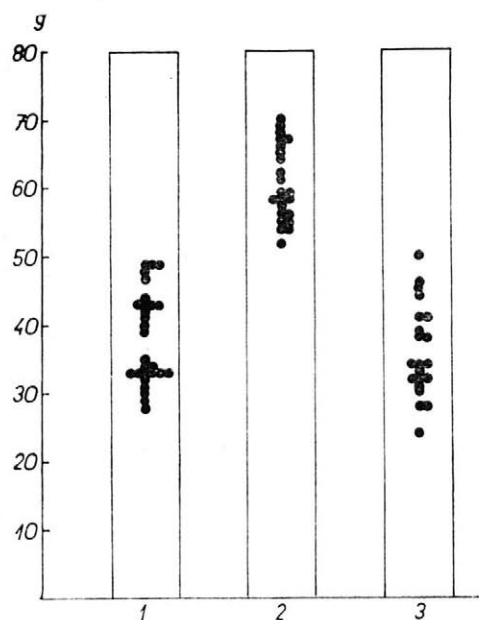
## MATERIÁL A METÓDY

Aurothioglukózu sme aplikovali dospelým albinotickým myšiam o váhe asi 20 g v dávke 1 mg/g ž. v. Zvieratá boli držané v miestnosti so stálou teplotou (asi 19 °C), boli kŕmené *ad libitum* Larsenovou diétou a mali stály prístup k vode. Stanovenie celkového tuku sme previedli u 51 pokusných myši tri až štyri mesiace po podaní aurothioglukózy a u 21 kontrolných zvierat toho istého veku. Tuk zo sušiny rozomletých myši sme stanovovali podľa Soxhleta. Výsledky sme štatisticky vyhodnotili.

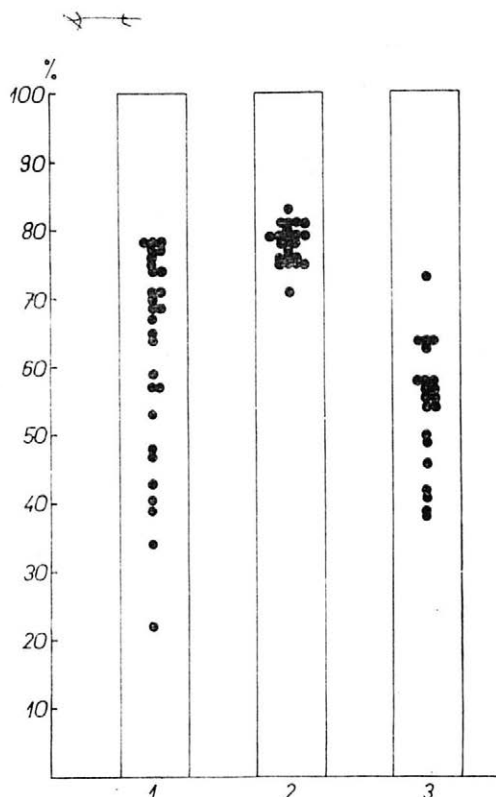
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Časť myši, ktorým bola aplikovaná aurothioglukóza, sa už prvý mesiac po injekcii preparátu výrazne odlišuje svojou váhou od myši kontrolných. Tento rozdiel sa v druhom a treťom mesiaci po podaní preparátu ešte zvýši. V tomto

období rozdiel priemeru váh pokusných zvierat v porovnaní s kontrolami je vysoko štatisticky významný (Šimková, Boďa — v tlači). Skupina pokusných zvierat, ktorá sa svojou váhou podobá zvieratám kontrolným, javí — pokiaľ ide o obsah tuku — značný rozptyl, približujúc sa na jednej strane zvieratám obéznym už na základe váhy a na strane druhej zvieratám kontrolným — z toho dôvodu sme pri grafickom znázornení výsledkov našich experimentov rozdelili pokusné zvieratá na „obézne“ a „neobézne“. Hranicou pre toto rozdelenie bola váha 50 g, ktorú kontrolné zvieratá — okrem jedného prípadu — nedosahovali. Za „neobézne“ pokusné myši sme označili tie, ktorých váha nedosahovala 50 g a skupinu „obéznych“ myši tvorili tie, ktoré vážili 50 a viac gramov. Pri štatistickom hodnotení sme však porovnali s kontrolnými zvieratmi obe skupiny pokusných zvierat spolu, tj. obézne i neobézne.



1. Váha myši po vykrvení  
1 — neobézne po aplikácii ATG  
2 — obézne po aplikácii ATG  
3 — kontroly



2. Percento tuku v sušine myši  
1 — neobézne po aplikácii ATG  
2 — obézne po aplikácii ATG  
3 — kontroly

Na obr. 1 je znázornená váha myši v g po vykrvení a odstránení mozgu — tri mesiace po podaní aurothioglukózy (stĺpec 1 a 2) a u zvierat kontrolných (stĺpec 3). Z obrázku je vidieť, že váha kontrolných zvierat (stĺpec 3) kolíše v rozmedzí od 29—50 g. Neobézne pokusné zvieratá (stĺpec 1) sa svojou váhou veľmi podobajú skupine zvierat kontrolných a ich váha kolíše od 29—49 g. Váha skupiny zvierat „obéznych“ (stĺpec 2) kolíše v rozmedzí od 54—69 g. Pri štatistickom hodnotení sme porovnali obidve skupiny pokusných myši (stĺpec

1 a 2) so skupinou kontrolných zvierat (stĺpec 3). Priemerná váha pokusných predstavovala 48 g, u kontrolných 35 g. Rozdiely priemeru váh boli štatisticky významné ( $P < 0,001$ ).

Na obr. 2 sme znázornili celkové množstvo tuku v percentách zo sušiny myši — tri mesiace po aplikácii aurothioglukózy. Ponechali sme ako na prvom obrázku rozdelenie na tri skupiny, tj. podľa váhy „neobézne“, „obézne“ a kontrolné zvieratá. Z obrázku je jasne vidieť, že skupina pokusných zvierat „neobéznych“ v stĺpci 1., ktorá sa svojou váhou podobala skupine kontrolných zvierat (obr. 1), pri stanovení celkového tuku prejavuje značný rozptyl. Celkové množstvo tuku u nich kolíše od 22—78 %. Väčšia časť zvierat sa svojim celkovým množstvom tuku podobá skupine „obéznych“ myši (stĺpec 2) u ktorých percento celkového tuku kolíše od 71—83 %. Táto skupina zvierat, ktorá už svojou váhou sa výrazne odlišuje od ostatných pokusných i od kontrolných zvierat, tvorí — pokiaľ ide o percento tuku — veľmi homogennú skupinu. U kontrolných zvierat kolíše množstvo celkového tuku v rozmedzí od 45—65 %, v jednom prípade 72 %. Priemerne predstavuje množstvo tuku u kontrol 54 %, u pokusných (stĺpec 1 a 2) 69 %. Pri štatistickom hodnotení celkového množstva tuku sme porovnali percento tuku oboch skupín pokusných zvierat (stĺpec 1 a 2) s percentom tuku u kontrolných zvierat. Rozdiel bol u oboch skupín vysoko štatisticky významný ( $P < 0,001$ ). Pomerne vysoká smerodatná odchýlka u pokusných zvierat ( $\pm 14,165$ ) je vyjadrením značného rozptylu v percente tuku u zvierat „neobéznych“. Percento tuku u kontrolných zvierat kolíše tiež v dosť veľkom rozmedzí (smerodatná odchýlka  $\pm 9,1488$ ).

H a n a kol. (1965) u svojich krýs, u ktorých boli prevedené hypotalamické lézie, zistil viac celkového tuku ako u kontrolných krýs, hoci priemerná váha tela obéznych zvierat nebola vyššia v porovnaní s kontrolnými zvieratmi. Podobne zistil väčšie množstvo telového tuku u krýs s hypotalamickými léziami i V a n P u t t e n a kol. (1955).

Naše výsledky sú v súhlase s týmito závermi v tom, že sme zistili vysoké percento tuku i u zvierat, ktoré na základe váhy obézne neboli. Na rozdiel od H a n a a kol. (1965) sme však zistili štatisticky významný rozdiel vo váhe pokusných a kontrolných zvierat. Štatisticky významný rozdiel priemeru váh sme zistili (Š i m k o v á, B o ě ě — v tlači) i u mladých zvierat po aplikácii aurothioglukózy. H a n a kol. (1965) pracoval s mladými zvieratmi po odstave a hypotalamické lézie vyvolali u jeho pokusných zvierat okrem uvádzaných zmien i štatisticky významné zníženie rastu.

Rozdielnosti vo výsledkoch by azda bolo možné vysvetliť rôznym pokusným materiálom. V oboch prípadoch išlo síce o hypotalamické lézie, H a n a kol. (1965) ich však vyvolal u krýs stereotaxickou metódou, v našich pokusoch boli lézie vyvolané aplikáciou aurothioglukózy myšiam.

Zdá sa, že hypotalamické lézie či už prevedené stereotaxickou metódou alebo aplikáciou aurothioglukózy majú — pokiaľ ide o ukladanie tuku — podobný účinok. Je možné, že rozdiely vo výsledkoch sú spôsobené rozličným rozsahom lézie. B e r n a r d i s a kol. (1963) nezistil napríklad signifikantné zníženie rastu u svojich krýs prevedením menších lézií.

Z našich pokusov zostáva nezodpovedané, na úkor čoho sa zvýšilo celkové množstvo tuku u zvierat, ktoré sa svojou váhou podobali kontrolám, ale mali vyššie percento celkového tuku. Možno predpokladať, že by to mohlo ísť na úkor bielkovinového tkaniva. Pre zodpovedanie tejto otázky bude však treba urobiť ďalšie pokusy.

Na základe našich výsledkov možno povedať, že aurothioglukóza má za



následok štatisticky významné zmeny váhových prírastkov u pokusných myší a vyvoláva u nich zmeny v tvorbe a v ukladaní tuku. Váhové zmeny sú zreteľné už voľným okom asi u 45 % zvierat. Pri hodnotení celkového množstva tuku tento je v porovnaní s kontrolnými zvieratmi vyšší u väčšieho množstva zvierat, ako pri posudzovaní len na základe váhy, čiže určité percento zvierat možno pokladať za obézne bez zmien váhy tela.

## Literatúra

- BERNARDIS L. L., BOX B. M., STEVENSON Y. A. F., 1963, Growth following hypothalamic lesions in the weanling rat. *Endocrinology* 72 : 684-692.
- HAN P. W., LIU C. H., CHU K. C., MU I. Y., LIU A. C., 1965, Hypothalamic obesity in weanling rats. *Am. J. Physiol.* 209 : 627-631.
- MAYER J., MARSHALL N. B., 1965, Specificity of goldthioglucose for ventromedial hypothalamic lesions and hyperphagia. *Nature* 178 : 1399.
- VAN PUTTEN L. M., VAN BEKKUM E. W., QUERIDO A., 1955, Influence of hypothalamic lesions producing hyperphagia and of feeding regimens on carcass composition in the rat. *Metab. Clin. Exptl.* 4 : 68-74.
- ŠIMKOVÁ D., BOĎA K., 1971, Váhové prírastky dospelých a mladých myší po aplikácii aurothioglukózy. *Folia vet.* (v tlači).
- ŠIMKOVÁ D., ŠKARDA R., BOĎA K., 1967a, Patohistologické afekcie hypotalamu u krýs po aplikácii aurothioglukózy. *Folia vet.* XI. 2 : 77-81.
- ŠIMKOVÁ D., ŠKARDA R., BOĎA K., 1967b, Patohistologické afekcie hypotalamického ventromediálneho jadra a širšieho okolia po aplikácii aurothioglukózy u myší. *Vet. Med. (Praha)* 10 : 557-560.

Došlo dne 12. 11. 1970

---

ШИМКОВА Д., БОДЯ К. (Ветеринарный институт, Кошице, Чехословакия). Содержание жира у мышей после применения аурутиоглюкозы. *Vet. Med. (Praha)* 16 (9) : 583-587, 1971.

Aurothioglucose вызывает у определенного количества взрослых мышей ожирение, причем, не у всех животных оно проявляется в изменениях веса, а только в увеличении общего количества жира, в среднем на 15 %, что по сравнению с контрольными животными статистически достоверно ( $P < 0,001$ ).

aurothioglucose; жир

ŠIMKOVÁ D., BOĎA K. (University of Veterinary Medicine, Košice, Czechoslovakia). *Fat Contents in Mice after Aurothioglucose Application*. *Vet. Med. (Praha)* 16 (9) : 583-587, 1971.

Aurothioglucose causes obesity in a certain number of adult mice; this need not show in changes of weight in all animals, but shows only in the total amount of fat increasing by 15 % on the average, which, compared to control animals, is statistically significant ( $P < 0,001$ ).

aurothioglucose; fat

ŠIMKOVÁ D., BOĎA K. (Veterinärhochschule, Košice, Tschechoslowakei). *Fettgehalt bei Mäusen nach Aurothioglucoseapplikation*. *Vet. Med. (Praha)* 16 (9) : 583-587, 1971.

Aurothioglucose ruft Obesität bei einer gewissen Anzahl erwachsener Mäuse hervor, wobei diese sich nicht bei allen Tieren in Gewichtsänderungen zeigen muß,

jedoch tritt nur in einer Erhöhung der gesamten Fettmenge durchschnittlich um 15 % in Erscheinung, was im Vergleich mit den Kontrolltieren statistisch signifikant ist ( $P < 0,001$ ).

Aurothioglukose; Fett

---

*Adresa autorov:*

MVDr. D. Š i m k o v á, CSc., prof. MVDr. K. B o ě a, DrSc., Vysoká škola veterinárska, Košice, Komenského 71

---

**Výběr z nových přírůstků**  
**Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTI**  
**na úseku veterinářství**

- Cion, R. A. E 34.475  
**Diferencialnaja diagnostika boleznej svinej.** Leningrad, Kolos 1970. 94 s.  
 5 obr. tb. (Prase — nemoci nakažlivé — diagnostika diferenciální)
- Parker, W. H. E 34.589  
**Health and disease in farm animals.** For those concerned with Animal Husbandry. Oxford, Pergamon press 1970. 301 s. 21 obr. (Veterinární patologie — příručky)
- Belschner, H. G. D 58.914  
**Horse diseases. Agricultural and livestock series.** Sydney, Angus and Robertson Ltd. 1969. 258 s. 83 obr. (Kůň — nemoci — příručky)
- D 58.018  
**Bolezní krupnogo rogatogo skota.** Moskva, Kolos 1970. 423 s. obr. (Veterinární patologie — skot — příručky)
- D 23.895/661  
**Reproductive diseases in dairy cattle in Northeastern United States** A ten-year summary, 1960-1970. Burlington, Vermont agric. exp. station 1970. 19 s. Bulletin 661. (Skot mléčný — rozmnožování — nemoci — výzkum — USA)
- Blake, J. T. — Thomas, Don W. C 2.510/154  
**Occurrence and distribution of acute bovine pulmonary emphysema (Grunts) in Utah cattle.** Logan (Utah), Agric. exp. station 1970. 21 s. 5 obr. 3 tb. Circular 154. (Skot — nemoci plicní — rozedma — výzkum)
- Hartmans, J. D 32.829/412  
**Copper deficiency in dairy cattle under field conditions.** Wageningen, IBS 1969. 42-48 s. 2 obr. 1 tb. Mededeling 412. (Skot — nemoci fyziologické — měď — nedostatek — výzkum — Holandsko)

# **Obsah**

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Zuffa A.: Imunizácia proti Aujeszského chorobe — izolovanie klónu avirulentného pre králiky a morčatá a hodnotenie jeho imunogenity . . . . . | 525 |
| Renda V., Ryšánek D.: Stabilizace buněčných elementů mléka a reprodukovatelnost elektronického stanovení jejich počtu . . . . .               | 539 |
| Čermák O.: Zhodnocení některých reprodukčních vlastností býků amerického zebu . . . . .                                                       | 549 |
| Arendarčík J., Halagan J.: Sérový gonadotropín (PMSG) krížencov kobýl malého plemena — biologické a imunologické vlastnosti . . . . .         | 563 |
| Řehulová E., Sýkora I.: Neurální komplikace po preventivním očkování beagů proti vzteklině . . . . .                                          | 571 |
| Zapletal O.: Vliv pH prostředí a některých sloučenin kovů na enzymatickou aktivitu rostlinné ureázy . . . . .                                 | 575 |
| Šimková D., Boďa K.: Obsah tuku u myší po aplikácii aurothioglukózy . . . . .                                                                 | 583 |

# **Содержание**

|                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Жуффа А.: Иммунизация от болезни Ауески — изолирование авирулентного клона для кроликов и морских свинок и оценка его иммуногенности . . . . . | 537 |
| Ренда В., Рышанек Д.: Стабилизация клеточных элементов молока и воспроизводительность электронного определения их числа . . . . .              | 546 |
| Чермак О.: Оценка некоторых воспроизводительных способностей быков американского зебу . . . . .                                                | 562 |
| Арендарчик И., Халаган И.: Сывороточный гонадотропин (PMSG) помесей кобыл малой породы — биологические и иммунологические свойства . . . . .   | 569 |
| Ржегулова Э., Сикора И.: Нейральные осложнения вследствие профилактической прививки биглов против бешенства . . . . .                          | 573 |
| Заплетал О.: Влияние pH среды и некоторых соединений металлов на энзиматическую активность растительной уреазы . . . . .                       | 581 |
| Шимкова Д., Бодя К.: Содержание жира у мышей после применения ауриотглюкозы . . . . .                                                          | 586 |

# **Content**

|                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Zuffa A.: Immunization against Aujeszky's Disease — Isolation of the Clone Avirulent for Rabbits and Guinea-Pigs and the Evaluation of its Immunogenicity . . . . . | 537 |
| Renda V., Ryšánek D.: Stabilization of Milk Cell Elements and the Reproducibility of the Electronic Determination of their Number . . . . .                         | 546 |
| Čermák O.: Evaluation of Some Reproductive Properties of American Zebu Bulls . . . . .                                                                              | 562 |
| Arendarčík J., Halagan J.: Serum Gonadotropine (PMSG) in the Cross-breeds of the Mares of the Small Breed . . . . .                                                 | 569 |
| Řehulová E., Sýkora I.: Neural Complications after Preventive Vaccination of Beagles against Rabies . . . . .                                                       | 573 |
| Zapletal O.: The Influence of Environment and of Some Metal Compounds on the Enzymatic Activity of Plant Urease . . . . .                                           | 581 |
| Šimková D., Boďa K.: Fat Contents in Mice after Aurothioglucose Application . . . . .                                                                               | 586 |

# **Inhalt**

|                                                                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Zuffa A.: Immunisierung gegen die Aujeszkysche Krankheit — Isolierung eines für Kaninchen und Meerschweinchenavirulenten Klons und Bewertung dessen Immunogenität . . . . . | 537 |
| Renda V., Ryšánek D.: Stabilisierung der Milchezellenelemente und Reproduzierbarkeit der elektronischen Bestimmung ihrer Anzahl . . . . .                                   | 547 |
| Čermák O.: Bewertung einiger Reproduktionseigenschaften amerikanischer Zebubullen . . . . .                                                                                 | 562 |
| Arendarčík J., Halagan J.: Serumgonadotropin (PMSG) der Kreuzungsprodukte von Kleinpferdstuten . . . . .                                                                    | 569 |
| Řehulová E., Sýkora I.: Neurale Komplikation nach einer präventiven Impfung der Beagles gegen Tollwut . . . . .                                                             | 574 |

|                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Zapletal O.: Einfluß des pH-Wertes des Milieus und einiger Metallverbindungen auf die enzymatische Aktivität der Pflanzenurease . . . . . | 582 |
| Šimková D., Boďa K.: Fettgehalt bei Mäusen nach Aurothioglucoseapplikation . . . . .                                                      | 586 |

# TABLE DES MATIÈRES

|                                                                                                                                                                 |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Žuffa A.: Immunisation contre la maladie d'Aujeszki — isolement du clone avirulent pour les lapins et les cobayes et évaluation de son immunogénité (538)       |  |
| Renda V., Ryšánek D.: Stabilisation des éléments cellulaires du lait et reproductibilité de la détermination électronique de leur nombre (res. An/546, Al/547). |  |
| Čermák O.: Evaluation de certaines propriétés de reproduction des taureaux de zébu américain (res. An, Al/562).                                                 |  |
| Arendarčík J., Halagan J.: Gonadotropine sérique (PMSG) des croisés des juments de petite race — propriétés biologiques et immunologiques (res. An, Al/569).    |  |
| Řehulová E., Sýkora I.: Complications neurales à la suite de l'inoculation préventive des beagles contre la rage (res. An/573, Al/574).                         |  |
| Zapletal O.: Influence du pH du milieu et de certains composés de métaux sur l'activité enzymatique de l'uréase végétale (res. An/581, Al/582).                 |  |
| Šimková D., Boďa K.: Teneur en graisses chez les souris à la suite de l'application de l'aurothioglucose (res. An, Al/586).                                     |  |