

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

4

ROČNÍK 17 (XLV)
PRAHA, 1972
DUBEN 1972
CENA 10 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Řídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král (předseda), prof. MVDr. Kolo-
man Boča, DrSc., doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr.
Jaroslav Dražan, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., MVDr.
Miloš Halaša, CSc., prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc., doc.
MVDr. Jozef Hrušovský, CSc., MVDr. Jaromír Lát, MVDr.
Andrej Mačička, CSc., doc. MVDr. Ladislav Polák, CSc.,
MVDr. Jiří Srna, prof. MVDr. Jaroslav Vrtiak, DrSc.

Vedoucí redaktorka ing. Jovanka Václavíková

© Ústav vědeckotechnických informací, Praha 1972

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

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

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

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

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

IMUNIZÁCIA PROTI AUJESZKÉHO CHOROBE – IMUNOGENITA AVIRULENTNÉHO KLÓNU BUK-TK-300/9,2 PRE HOVÄDZÍ DOBYTOK

A. Žuffa, J. Salaj

Stredisko pre výskum a vývoj pri Biovete, Nitra

ŽUFFA A., SALAJ J. *Imunizácia proti Aujeszkeho chorobe – imunogenita avirulentného klónu Buk-TK-300/9,2 pre hovädzí dobytok*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 201-210, 1972.

Avirulentný klón Buk-TK-300/9,2 stimuluje po dvojrázovom podaní veľkého inokula dobytka vývoj imunity doprevádzaný tvorbou protilátok v titroch 1 : 8-128. Úroveň primárnej aj sekundárnej odpovede je v priamom vzťahu k obsahu vírusu vo vakcinačnej dávke, pričom veľké inokulum pripraví organizmus k intenzívnej sekundárnej odpovedi lepšie, ako malé inokulum. Pri podaní vírusu v dávke okolo $10^{6,5}$ TKID₅₀ sa dokazujú protilátky u väčšiny zvierat už po prvom podaní a revakcinácia vedie k vzostupu NP do vysokých titrov. Inokulum s obsahom okolo $10^{3,5}$ TKID₅₀ stimuluje tvorbu merateľných hladín NP len po revakcinácii, kým dvojrázové podanie vírusu v dávke $10^{1,5}$ TKID₅₀ ostane bez zistiteľnej protilátkovej odpovede. Pri východiskových titroch 1 : 8-128 pretrvávajú protilátky v nízkych hodnotách najmenej počas 11 mesiacov, pričom na ďalšie očkovanie reagujú zvieratá anamnesticke. Vakcinované zvieratá sú chránené proti masívnej infekcii virulentným vírusom.

Aujeszkeho vírus; avirulentný klón; hovädzí dobytok; tvorba protilátok; odolnosť proti infekcii

V predchádzajúcom oznámení sme referovali o spôsobe získania avirulentného klónu Buk-TK-300/9,2 Aujeszkeho vírusu (Žuffa 1971a). Tento klón je neškodný pre králiky, morčatá a všetky druhy hospodárskych a užitkových zvierat pri parenterálnom podaní ľubovoľných dávok vírusu. Napriek strate virulencie si zachoval klón Buk-TK-300/9,2 dostatok antigenity pre laboratórne zvieratá a ovce (Žuffa 1971a, b); po dvojrázovom podaní primeraného inokula vyvolá tvorbu neutralizačných protilátok do vysokých titrov a chránenosti proti vyvolávajúcej infekcii. V ďalšom sme chceli stanoviť imunogénnu potenciu avirulentného vírusu pre dobytok s tým, že v prípade získania kladných výsledkov by bol použiteľný pre aktívnu imunizáciu všetkých druhov užitkových a hospodárskych zvierat, s výnimkou ošipaných. Za tým účelom sme zisťovali úroveň protilátkovej odpovede u mladého dobytka očkovaného jednorázovo a dvojrázovo odstupňovanými dávkami vírusového klónu Buk-TK-300/9,2 a u menšieho počtu zvierat aj chránenosť proti infekcii virulentným vírusom. Dosiahnuté výsledky predkladáme v tomto oznámení.

MATERIÁL A METÓDY

VÍRUSY

Avirulentný klón Buk-TK-300/9,2 sme vyseletovali trojnásobnou plakovou purifikáciou z vírusovej populácie, ktorá predstavovala 100. pasáž pôvodne atenuovaného kmeňa Buk-TK-200 (Žuffa 1963) na kultúrach KEB pri 30 °C. Postup použitý pri izolácii avirulentného vírusu ako aj niektoré jeho vlastnosti sa podrobne opisujú v predchádzajúcom oznámení (Žuffa 1971a). Pri príprave vírusu pre očkovanie sme dobre narastené kultúry KEB v Rouxových fľašiach infikovali dávkou okolo 10^6 TKID₅₀, inkubovali počas 48 hod. pri 30 °C a potom pri 37 °C. Vírus predstavovalo infekčné médium odobraté po úplnom rozpade tkaniva. Po odstredení a pridaní 5 % Laktína a 1 % glukózy sme vírus rozdelili do ampuliek po 2 ml, dehydrovali za chladu a ampulky zatačili pod vákuom (Žuffa a kol. 1969a). Rehydrovaním obsahu jednej ampulky v 10 ml ústojného fyziologického roztoku sa získalo päť imunizačných dávok. K núdzovému očkovaniu dobytka v chovoch po prepuknutí nákazy sa použila obdobným spôsobom komerčne pripravená vakcína.

TKANIVOVÉ KULTÚRY

Jednovrstevné kultúry KEB v Rouxových fľašiach pre produkciu vírusu a v skúmavkách pre titráciu vírusu a protilátok sme pripravili rovnako ako sme opísali skôr (Žuffa a Škoda 1962).

TITRÁCIA VÍRUSU

Obsah vírusu v inokulu, vyjadrený v TKID₅₀, sa zisťoval titráciou vírusu riedeného desaťnásobne v geometrickom radu, používajúc najmenej štyri skúmavky KEB na jedno riedenie. TKID₅₀ sa vypočítal podľa vzorca Reeda a Muencha (1936).

TITRÁCIA PROTILÁTOK

Vírus nariadený tak, aby obsahoval okolo 200 TKID₅₀ na 0,1 ml, sa zmiešal s rovnakými množstvami sériových dvojnásobných riedení séra. Po neutralizácii, ktorá prebiehala 1 hod. pri 37 °C, sa každým riedením očkovali po tri skúmavkové kultúry KEB na jedno riedenie v množstve po 0,1 ml a výsledok sa odčítal na 5.—7. deň. Za titer neutralizačných protilátok (NP) sa považovalo to riedenie séra, ktoré celkom neutralizovalo vírus aspoň v dvoch skúmavkách.

OČKOVANIE DOBYTKA

Imunogenita vírusu Buk-TK-300/9,2 sa zisťovala očkovaním mladého výkrmového dobytka, býčkov a jalovic, vo veku od pol do dvoch rokov, desaťnásobnými riedeniami vírusu v množstve po 2,0 ml s. c. a hodnotila sa podľa úrovne protilátkovej odpovede. Za účelom zistenia vzťahu medzi veľkosťou inokula a tvorbou protilátok sme očkovali skupiny zvierat nasledovne:

- a) neriedeným inokulom pri prvom podaní i revakcinácii,
- b) odstupňovanými dávkami vírusu pri prvom očkovaní a neriedeným inokulom pri revakcinácii,
- c) neriedeným vírusom pri vakcinácii a odstupňovanými dávkami pri revakcinácii,

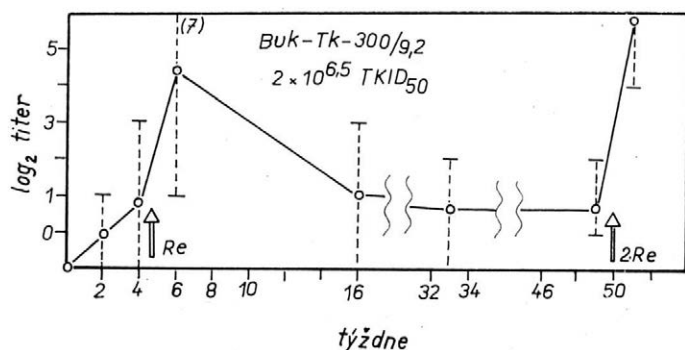
d) odstupňovanými dávkami vírusu pri prvom i druhom podaní.

Za účelom stanovenia obsahu sérových protilátok sme odoberali krvné vzorky pred očkovaním a revakcináciou a potom v intervaloch, ktoré sa udávajú vo výsledkoch. Očkované zvieratá sme pozorovali a počas 14 dní sa im merala telesná teplota. Stupeň imunity vyvolanej očkovaním sme testovali čelenžovaním vakcinovaných zvierat *i. m.* virulentným vírusom Rača-TK-5, resp. Old-TK-5. Očkovanie sa uskutočnilo na hospodárstvach ŠM Č. a A., vyvolávajúce infekcie v laboratórnych podmienkach.

VÝSLEDKY

PROTILÁTKOVÁ ODPOVEĎ U DOBYTKA PO DVOJRÁZOVOM OČKOVANÍ VEĽKÝM INOKULOM

Dvadsať zvierat sme očkovali neriedeným inokulom s obsahom okolo $2 \times 10^{6.5}$ TKID₅₀ vírusu a za štyri týždne sme všetky rovnakým spôsobom revakcinovali. Očkovanie ostalo bez akýchkoľvek termických aj celkových reakcií. V stanovených časových intervaloch až do 11. mesiaca od revakcinácie sme odoberali od pokusných zvierat krvné vzorky s cieľom stanoviť obsah NP. V tom čase sme desať zo sledovaných zvierat podrobili tretiemu očkovaniu a obsah NP v krvných sérach zistili za ďalších 14 dní. Výsledky sérologických vyšetrení sú znázornené na obr. 1. Vidieť, že väčšina zvierat vytvorila NP v preukazných titroch už po prvom očkovaní a revakcinácia viedla k vzostupu protilátok do vysokých titrov. Za 12 týždňov došlo však k poklesu protilátok na nízke hodnoty a na rovnakej úrovni pretrvávali po celé sledované obdobie. Na tretie podanie vírusu reagovali zvieratá anamnesticky, t. j. rýchlou tvorbou vysokých hladín NP.

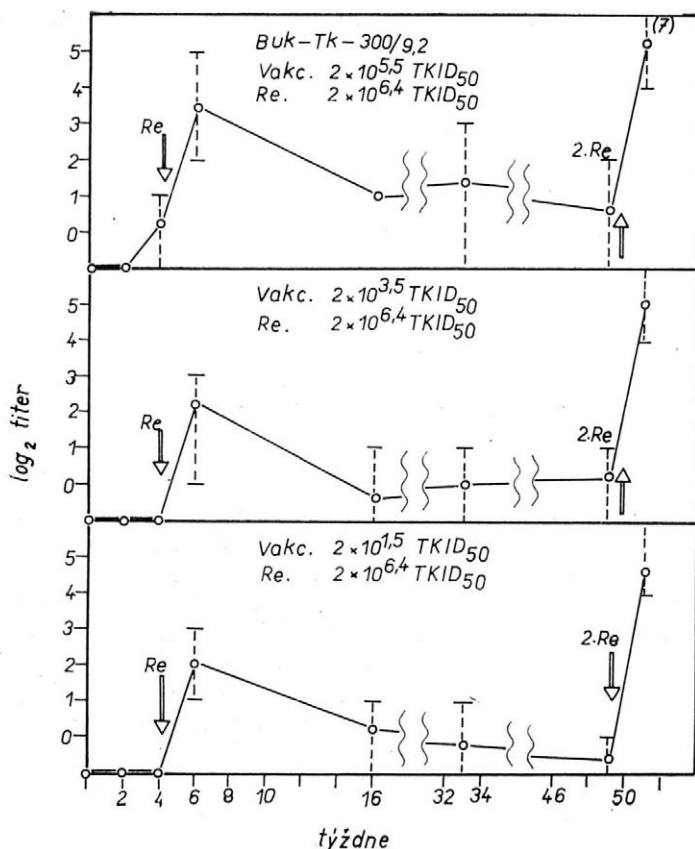


1. Protilátková odpoveď dobytká po dvojrázovom očkovaní veľkou dávkou vírusu Buk-TK-300/9,2

PROTILÁTKOVÁ ODPOVEĎ U DOBYTKA PO OČKOVANÍ ODSUPŇOVANÝMI DÁVKAMI A REVAKCINÁCII VEĽKOU DÁVKOU VÍRUSU

Po päť zvierat sme očkovali dávkami $2 \times 10^{5.5}$ TKID₅₀, $2 \times 10^{3.5}$ TKID₅₀, resp. $2 \times 10^{1.5}$ TKID₅₀ vírusu *s. c.* a za štyri týždne všetky revakcinovali jednotným inokulom s obsahom $2 \times 10^{6.4}$ TKID₅₀ vírusu. Rovnako ako v prvom pokuse sme za 11 mesiacov od revakcinácie uskutočnili tretie očkovanie neriedeným vírusom. Protilátková odpoveď zvierat, zaznamenaná po celé sledované obdobie, je znázornená na obr. 2. Po inokulácii riedeného vírusu sa s výnimkou

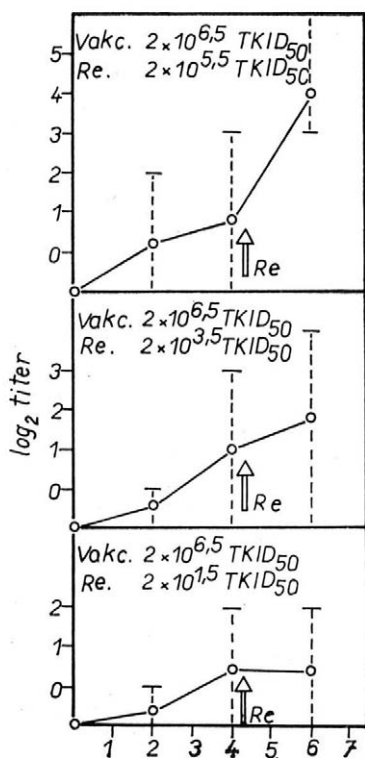
2. Protilátková odpoveď dobytká po očkovaní odstupňovanými dávkami a po revakcinácii jednotnou dávkou ($2 \times 10^{6,4}$ TKID₅₀) vírusu Buk-TK-300/9,2



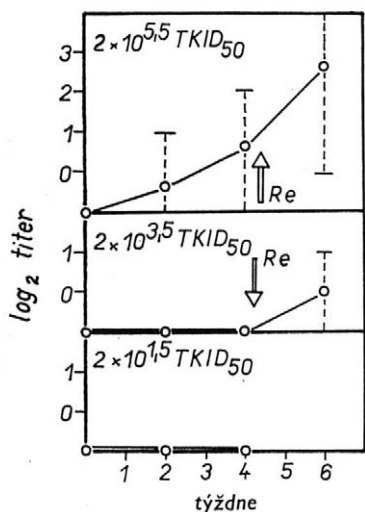
jedného zvieratá nezistili počas štyroch týždňov protilátky v merateľných titroch. Revakcinácia jednotným inokulom viedla k tvorbe NP, ktorých titry boli v priamej závislosti na obsahu vírusu v prvej vakcinačnej dávke. Protilátky pretrvávali u väčšiny zvierat v dokazateľných hodnotách po celé sledované obdobie a na tretie očkovanie reagovali vo všetkých troch skupinách anamnesticky. Zo zistených sérologických náleзов vyplýva, že pripravenosť organizmu k intenzívnej sekundárnej odpovedi je v priamej závislosti na obsahu živého vírusu v inokulu pri prvom podaní.

PROTILÁTKOVÁ ODPOVEĎ U DOBYTKA PO OČKOVANÍ VEĽKOU DÁVKOU A REVAKCINÁCII ODSUPŇOVANÝMI DÁVKAMI VÍRUSU

Pätnásť zvierat bolo očkovaných dávkou $2 \times 10^{6,5}$ TKID₅₀ vírusu Buk-TK-300/9,2 a za štyri týždne nato boli revakcinované, v skupinách po piatich, dávkami $2 \times 10^{5,5}$ TKID₅₀, $2 \times 10^{3,5}$ TKID₅₀, resp. $2 \times 10^{1,5}$ TKID₅₀ vírusu. Po prvom očkovaní vytvorila väčšina zvierat NP v preukazných titroch. Revakcinácia vyvolala signifikantný vzostup protilátok v skupinách, ktoré boli revakcinované dávkami $2 \times 10^{5,5}$ TKID₅₀ resp. $10^{3,5}$ TKID₅₀, kým zvieratá, ktoré dostali $2 \times 10^{1,5}$ TKID₅₀ vírusu, ostali bez preukaznej protilátkovej odpovedi (obr. 3). Uvedené sérologické nálezy svedčia pre to, že u imunologicky pripravených zvierat je potrebné pre navodenie vysokých titrov protilátok inokulum s vysokým obsahom vírusu.



3. Protílátková odpoveď dobytka po očkovaní jednotnou ($2 \times 10^{6,5}$ TKID₅₀) a revakcinácii odstupňovanými dávkami vírusu Buk-TK-300/9,2



4. Protílátková odpoveď dobytka po dvojrázovom očkovaní odstupňovanými dávkami vírusu Buk-TK-300/9,2

PROTILÁTKOVÁ ODPOVEĎ U DOBYTKA PO DVOJRÁZOVOM PODANÍ ODSUPŇOVANÝCH DÁVOK VÍRUSU

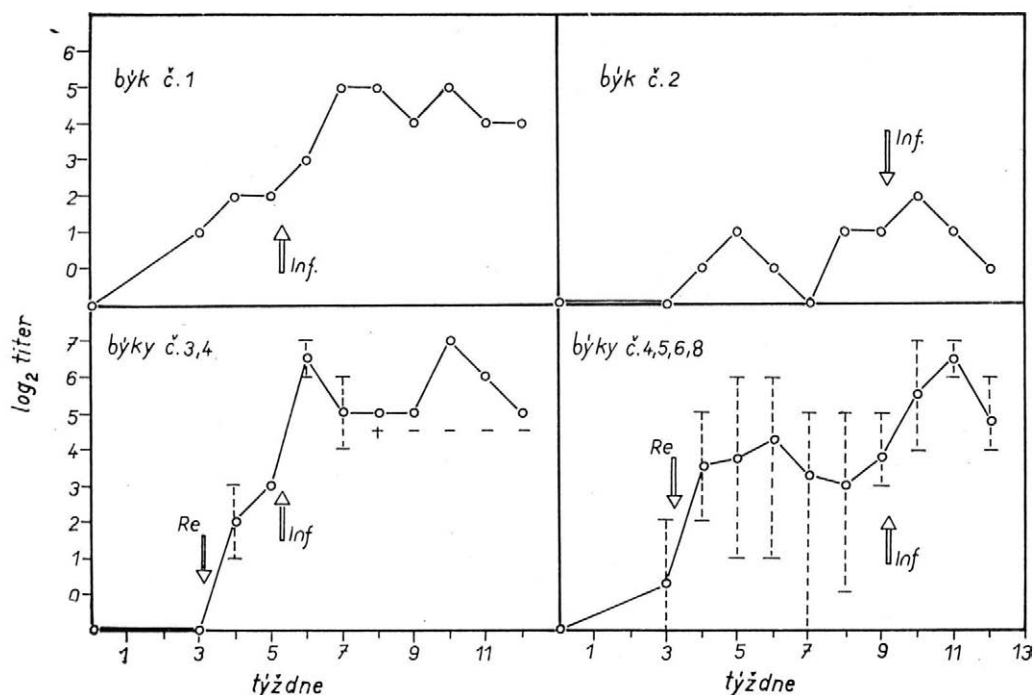
Pre potvrdenie výsledkov obidvoch predchádzajúcich pokusov sme očkovali skupiny po päť zvierat dávkami vírusu okolo $2 \times 10^{5,5}$ TKID₅₀, $2 \times 10^{3,5}$ TKID₅₀, resp. $2 \times 10^{1,5}$ TKID₅₀ dvojrázovo v intervale štyroch týždňov. Výsledky sérologických vyšetrení sú sumarizované na obr. 4. Inokulum s obsahom $2 \times 10^{5,5}$ TKID₅₀ vírusu vyvolalo tvorbu preukazných hladín NP už pri prvom podaní so signifikantným vzostupom titrov po revakcinácii; pri použití inokula $2 \times 10^{3,5}$ TKID₅₀ sa dokázali preukazné hodnoty NP len po revakcinácii, kým dvojrázové podanie vírusu v dávke $2 \times 10^{1,5}$ TKID₅₀ ostalo bez merateľnej protílátkovej odpovedi.

CHRÁNENOSŤ DOBYTKA PO OČKOVANÍ VÍRUSOM BUK-TK-300/9,2 PROTI INFEKCIÍ VIRULENTNÝM VÍRUSOM

Desať býčkov (č. 1–10) vo veku 12–16 mesiacov bolo očkovaných dávkou $10^{5,6}$ TKID₅₀ vírusu, dve zvieratá (č. 11 a 12) ostali neošetrené ako kontroly. Osem z očkovaných (č. 3–10) bolo za tri týždne revakcinovaných rovnakou dávkou vírusu. Za dva týždne nato boli zvieratá č. 1, 3, 7 a 11 infikované *i. m.* inokuláciou vírusu Rača-TK-5 v dávke $10^{6,0}$ TKID₅₀. Na 9. deň *p. i.* ochorel býk č. 11 a do 24 hodín uhynul za charakteristických príznakov Au. ch.; na 15. deň ochorel a bol zabitý býk č. 7. U obidvoch sa izolačnými pokusmi na skúmavkových kultúrach KEB dokázala v mozgu a predĺženej mieche prítomnosť infekčného vírusu. Zvieratá č. 2, 4, 5, 6, 8 a 10 boli podrobené vyvolávajúcej infekcii Old-TK-5, v dávke $10^{5,5}$ TKID₅₀ vírusu. Kontrola ochorela a uhynula za príznakov Au. ch. na 11. deň *p. i.*, kým všetky vakcinované zvieratá infekciu prežili (tab. I). Výsledky sérologických nálezov po vakcinácii, revakcinácii a infekcii sú zhrnuté na obr. 5.

OBSAH PROTILÁTKOV V SÉRACH DOBYTKA OČKOVANÉHO ŽIVOU VAKCÍNOU Z AVIRULENTNÉHO KLÓNU BUK-TK-300/9,2 V TERÉNNYCH PODMIENKÁCH

Po tom, čo sa v rámci kontrolovaných pokusov preukazne dokázalo, že dvojrázové podanie dostatočnej dávky avirulentného vírusu vyvolá solídnu imunitnú odpoveď, použili sme ho



5. Priebeh hladín NP po očkovaní dobytká avirulentným vírusom Buk-TK-300/9,2 a vyvolávajúcej infekcii virulentnými kmeňmi Rača-TK-5 resp. OLD-TK-5

I. Chránenosť dobytká po očkovaní avirulentným vírusom Buk-TK-300/9,2 proti infekcii virulentným vírusom

Označenie zvierat	Infekcia uskutočnená za týždňov po		Titer NP v čase infekcie	Výsledok infekcie	Titer NP za dva týždne po infekcii
	vakcinácii	revakcinácii			
1	5	—	4	prežil	32
2	9	—	2	prežil	4
3	5	2	8	prežil	64
4	5	2	8	prežil	64
5	5	2	32	prežil	128
7	5	2	8	uhynul na 15. deň p. i.	16
6	9	6	8	prežil	64
8	9	6	16	prežil	128
9	9	6	32	prežil	64
10	9	6	16	prežil	32
11	—	—	—	uhynul na 9. deň p. i.	—
12	—	—	—	uhynul na 11. deň p. i.	—

ako živú vakcínu pre núdzové očkovanie dobytka a oviec v chovoch po prepuknutí nákazy. Za určitý čas po očkovaní sme získali z viacerých chovov väčší počet krvných vzoriek, ktoré sme vyšetrili na obsah sérových protilátok. Výsledky vyšetrovaní sú zhrnuté v tab. II.

V jednom z vakcinovaných chovov sme za účelom získania sér s vysokým obsahom protilátok uskutočnili tretie očkovanie vysoko atenuovaným kmeňom Buk-TK-900/IV, a, ktorý sa používa na prípravu živej Aujeszkého vakcíny pre ošipané (Žuffa, Salaj 1971) v dávke 10 ml neriedenej infekčnej tekutiny ($= 10^{8,0}$ TKID₅₀). Za 7 dní po očkovaní sa u jednotlivých zvierat dokázali protilátky v titroch 1 : 8–512 (tab. III).

II. Obsah neutralizačných protilátok v sérach dobytka očkovaného živou vakcínou z avirulentného kmeňa Buk-TK-300/9,2

Riedenie	Pozitívnych výsledkov	
	počet	%
O	13	8,2
K	22	14,0
2	38	24,0
4	28	17,8
8	26	16,5
16	16	10,0
32	11	7,0
64	4	2,5
Celkom	158	100,0

III. Titre neutralizačných protilátok u dobytka po dvojrázovom očkovaní vírusom Buk-TK-300/9,2 a revakcinácií vírusom Buk-TK-900/IV,a

Počet zvierat	Titre VN-protilátok	
	riedenia sér	pozitívny výsledok v riedení
20	8	2
	16	2
	32	5
	64	5
	128	2
	256	2
	512	2

DISKUSIA

O aktuálnosti ochranného očkovania dobytka proti Au. ch. v individuálnych prípadoch svedčí výskyt nákazy vo viacerých chovoch na území ČSSR, ako o nich referovali Tepper (1960), Rademacher a kol. (1963), Kabelík a kol. (1967) a Žuffa a kol. (1969b). Po prepuknutí nákazy ochorelo v jednotlivých zamorených objektoch 1,66 % až 42,6 % z celkového počtu ustajnených zvierat.

Výsledky opísaných pokusov svedčia pre to, že očkovaním dobytka avirulentným klónom Buk-TK-300/9,2 možno vyvolať solídnu ochranu proti masívnej experimentálnej infekcii. Sledovaním titrov NP u zvierat, ktorým boli aplikované rozličné dávky avirulentného vírusu pri prvom aj druhom podaní sa zistilo, že činiteľom určujúcim úroveň protilátok je veľkosť inokula. Zvieratá, ktoré odpovedali na prvé podanie veľkého inokula tvorbou protilátok v merateľných titroch, vykazovali po revakcinácii intenzívnejšiu sekundárnu odpoveď ako zvie-

ratá, u ktorých nebola primárna odpoveď doprevádzaná tvorbou merateľného množstva protilátok. Vyplýva z toho, že obsah vírusu vo vakcinačnej dávke je pre navodenie intenzívnej imunitnej odpovede rovnako dôležitý pri prvom očkovaní i pri revakcinácii. V súlade s tým sa vysoké hladiny protilátok dokázali len u zvierat očkovaných dvojrázove veľkou dávkou vírusu. Tieto zistenia sa však vzťahujú len na imunizačné dávky vírusu, s akými sme pracovali (najviac $10^{6,5}$ TKID₅₀). Rovnaké vzťahy medzi veľkosťou inokula a medzi intenzitou primárnej a sekundárnej odpovede sme pri použití vírusu Buk-TK-300/9,2 zistili aj na ovciach, psoch, mačkách, nie však na králikoch (Žuffa 1971a, b). Aj Bognár a Kucsera (1966) zaznamenali pri očkovaní oviec a Svobodová a kol. (1970) pri očkovaní dobytká živým avirulentným AV priamu závislosť medzi obsahom vírusu vo vakcinačnej dávke a trvaním vyvolanej imunity, resp. úrovňou protilátkovej odpovede. V našich pokusoch bola pre navodenie primárnej aj merateľnej sekundárnej odpovede potrebná približne rovnaká dávka, okolo $10^{3,5}$ TKID₅₀.

Pri vysokých východiskových titroch protilátok vyvolaných očkovaním, pretrvávala pripravenosť k pohotovej imunitnej odpovedi na opakovaný kontakt s vírusom najmenej počas 11 mesiacov. Znamená to, že v prípadoch pretrvávajúceho ohrozenia dobytká infekciou AV by sa po primárnej imunizácii vystačilo s jednorázovým očkovaním ročne.

Z 10 vakcinovaných zvierat odolalo 9 masívnej vyvolávajúcej infekcii. Jeden býček uhynul napriek tomu, že v čase infekcie vykazoval v krvnom sére NP v titre 1 : 8. Ukazuje sa preto, že prítomnosť protilátok nie je u dobytká indikátorom odolnosti proti infekcii AV. Obdobné zistenia zaznamenali pri očkovaní oviec živou Au. vakcínou Bognár a Kucsera (1966). Možno však vysloviť domnienku, že inokulácia veľkej dávky virulentného vírusu *i. m.* predstavuje drastickejší spôsob infekcie než s akým sa stretávajú zvieratá za prirodzených podmienok.

Získané sérologické nálezy aj odolnosť pokusných zvierat proti vyvolávajúcej infekcii virulentným vírusom svedčia pre to, že klón Buk-TK-300/9,2 si aj pri strate virulencie zachoval dostatok antigenity popri laboratórnych zvieratách (Žuffa 1971a) a ovciach (Žuffa 1971b) aj pre hovädzí dobytok. Strata virulencie vírusu pre králiky dovoľuje testovať jednotlivé šarže vakcíny na laboratórnom zvierati najnínmavejšom na experimentálnu infekciu AV, čo je z hľadiska zaistenia neškodnosti živej Aujeszského vakcíny, určenej pre veľké druhy hospodárskych zvierat, nezvyčajne významné. Prežitie králikov po *i. m.* podaní primerane veľkého inokula poskytuje dostatočnú záruku neškodnosti testovanej vakcíny pre dobytok a ostatné druhy zvierat, pre ktoré je vakcína určená.

U zvierat očkovaných núdzovo v chovoch dobytká po prepuknutí Au. ch. komerčne pripravenou vakcínou sa zaznamenali preukazne nižšie hladiny protilátok ako u zvierat očkovaných pokusnou vakcínou z rovnakého vírusového klónu. Rozdiely v protilátkovej odpovedi vyplývajú najskôr z rozdielného obsahu vírusu vo vakcinačnej dávke v obidvoch prípadoch. Jedným z charakteristických znakov avirulentného klónu Buk-TK-300/9,2, v porovnaní s atenuovanými kmeňmi adaptovanými na KEB, je nižší výťažok živého vírusu z infikovaných kultúr KEB najmenej o jednu log₁₀ jednotku. V záujme vyvolania vysokých titrov protilátok v rámci sekundárnej odpovedi ponúka sa možnosť použiť pre revakcináciu atenuovanú líniu kmeňa Bukurešť — Buk-TK-900/IV,a — s vyššou výťažnosťou, a tým aj s väčším obsahom vírusu v inokulu. Takýto postup je bez akéhokoľvek nebezpečia, nakoľko odolnosť vyvolaná prvým očkovaním avirulentným vírusom zabráni prípadnému vývoju postvakcinačných reakcií po podaní vírusu

Buk-TK-900/IV,a. Pri naočkovaní okolo tisíc kusov dobytká týmto vírusom pozorovali sa len u troch kráv prechodné poruchy celkového zdravotného stavu, kým niekoľko sto očkovaných oviec ostalo bez akýchkoľvek reakcií. Podaním tretej dávky atenuovaného vírusu Buk-TK-900/IV,a dobytku, ktorý bol predtým očkovaný virulentným klónom, sa získali imúnne séra s vysokým obsahom protilátok, z ktorých boli pripravené špecifické konjugované imunoglobulíny pre imunofluorescenciu veľmi dobrej kvality (Žuffa a kol. 1968).

Literatúra

- BOGNÁR K., KUCSERA GY., 1966, Untersuchungen mit schwach virulenter Aujeszký-Vakzine. Acta vet. Acad. Sci. Hung. 16 : 73-82.
- KABELÍK V., KRŠKA K., JERÁBEK P., 1967, Aujeszkého choroba u skotu ve Středočeském kraji. Veterinářství 17 : 413-417.
- RADEMACHER R., KALÁB J., VAŠÁTKO Z., SKROVNÝ R., 1963, První případ pseudovztekliny skotu ve Východočeském kraji. Veterinářství 13 : 53-54.
- REED L. J., MUENCH H. A., 1938, A simple method of estimating fifty per cent and points. Am. J. Hyg. 17 : 493-497.
- SVOBODOVÁ J., SABO A., BLÁŠKOVIC D., 1970, Immunogenicity of an attenuated pseudorabies virus in cattle. Acta virol. 14 : 263.
- TEPPER I., 1960, Vzplanutie Aujeszkého choroby v jednom spoločnom chove hovädzieho dobytká. Vet. časopis 9 : 425-431.
- ZUFFA A., 1963, Immunisierung gegen die Aujeszkysche Krankheit. I. Gewinnung des modifizierten Virus der Aujeszkyschen Krankheit. Arch. exp. Veterinärmed. 17 : 1325-1344.
- ZUFFA A., 1971a, Imunizácia proti Aujeszkého chorobe — izolovanie klónu avirulentného pre králiky a morčatá a hodnotenie jeho imunogenity. Vet. Med. (Praha) 9 : 525-538.
- ZUFFA A., 1971b, Imunogenita avirulentného klónu Buk-TK-300/9,2 (Pseudorabies) vírusu pre ovce. Acta veterinaria (Brno), v tlači.
- ZUFFA A., ŠKODA R., 1962, Niektoré biologické vlastnosti vírusu Aujeszkého choroby. Vet. časopis 11 : 155-164.
- ZUFFA A., MATIS J., PLEVA V., 1968, Studies on several strains of pseudorabies (Aujeszký) virus showing different virulence by means of the immuno- and acridine orange fluorescence. Arch. ges. Virusforsch. 24 : 396-405.
- ZUFFA A., ZÁK O., DUBAJ J., 1969a, Lyophilization of Aujeszký's (Pseudorabies) virus. I. Selection of protective medium. Vet. časopis 12 : 73-83.
- ZUFFA A., ŠKODA R., 1962, Niektoré biologické vlastnosti vírusu Aujeszkého choroby u hovädzieho dobytká v rokoch 1960 až 1967 v ČSSR. Veterinářství 19 : 15-19.
- ZUFFA A., SALAJ J., 1971, Imunizácia proti Aujeszkého chorobe — imunogenita vysoko atenuovaného kmeňa Buk-TK-900/a pre ošpané. Vet. Med. (Praha) 4 : 221-233.

Došlo dne 1. 7. 1971

ЖУФФА А., САЛАЙ Й. (Центр научного исследования и развития при Биовете, Нитра, Чехословакия). Иммунизация против болезни Ауески — иммуногенность авирулентного штамма БуК-ТК 300/9,2 для крупного рогатого скота. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 201-210, 1972.

Авирулентный штамм БуК-ТК-300/9,2 после введения двухкратной большой дозы прививочного материала крупному рогатому скоту стимулирует иммунитет, сопровождаемый образованием антител в титрах 1 : 8—128. Уровень первичной и вторичной реакции находится в прямой зависимости с содержанием вируса в дозе вакцины, причем большая доза вакцины подготавливает организм к интенсивной вторичной реакции лучше, чем небольшая доза вакцины. При вакцинации в дозе около $10^{6.5}$ TKID₅₀ можно установить антитела у большинства животных уже после первой прививки, а после повторной вакцинации NP доводится до высоких титров. Прививочный материал с содержанием около $10^{3.5}$ TKID₅₀

стимулирует образование измеримого уровня NP лишь после ревакцинации, тогда как двухкратное введение вируса в дозе $10^{1.5}$ TKID₅₀ не вызывает установившейся антителовой реакции. При начальных титрах 1 : 8—128 антитела сохраняются в небольшом количестве не менее 11 месяцев, причем на повторную вакцинацию животные реагируют анамнестически. Вакцинированные животные иммунизированы против массивной инфекции вирулентным вирусом.

вирус Ауески; авирулентный штамм; крупный рогатый скот; образование антител; устойчивость против инфекции

ZUFFA A., SALAJ J. (Bioveta, Centre for Research and Development, Nitra, Czechoslovakia). *Immunization against Aujeszky's Disease — Immunogenicity of the Avirulent Clone Buk-TK-300/9,2 for Cattle*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 201-210, 1972. The avirulent clone Buk-TK-300/9,2 stimulates the development of immunity accompanied by the formation of antibodies in titres 1 : 8-128 after the application of a large inoculum to cattle. The levels of the primary and secondary responses are in a direct relation to the content of the virus in the vaccine dose; the large inoculum was found to prepare the organism to an intensive secondary response with better results than a small inoculum. After the application of the virus in the dose about $10^{6.5}$ TKID₅₀ the antibodies are observed in most of animals already after the first dose, and revaccination results in a rise of NP to high titres. Inoculum containing about $10^{3.5}$ TKID₅₀ stimulates the formation of measurable NP levels only after revaccination, while a two-dose application of the virus ($10^{1.5}$ TKID₅₀) remains without any apparent antibody response. With initial titres 1 : 8-128 the antibodies remain in low values at least for 11 months; the response of the animals to further inoculation is of anamnestic nature. The vaccinated animals are protected against mass infection by a virulent virus.

Aujeszky's virus; avirulent clone; cattle; antibody production; resistance to infection

ZUFFA A., SALAJ J., (Zentralstelle für Forschung und Entwicklung bei Bioveta, Nitra, Tschechoslowakei). *Immunisierung gegen Aujeszky'sche Krankheit — Immunogenität des avirulenten Klon Buk-TK-300/9,2, für Rindvieh*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 201-210, 1972.

Nach der zweimaligen Verabreichung eines großen Inokulums dem Rindvieh stimuliert der avirulente Klon Buk-TK-300/9,2 die Immunitätsentwicklung, die von einer Antikörperbildung in Titern von 1 : 8-128 begleitet wird. Das Niveau der primären sowie sekundären Antwort steht in einem direkten Verhältnis zum Virusgehalt in der Vakzinationsgabe, wobei ein großes Inokulum den Organismus für eine intensive sekundäre Antwort besser als ein kleines Inokulum vorbereitet. Bei einer Verabreichung des Virus in einer Gabe von rund $10^{6.5}$ TKID₅₀ stellt man Antikörper bei den meisten Tieren bereits nach der ersten Verabreichung fest und eine Revakzination führt zu einem Anstieg der NP in hohe Titern. Ein Inokulum mit einem Gehalt von rund $10^{3.5}$ TKID₅₀ stimuliert die Bildung von meßbaren NP-Spiegeln nur nach einer Revakzination, während eine zweimalige Virusverabreichung in einer Gabe von $10^{1.5}$ TKID₅₀ ohne eine feststellbare Antwort bleibt. Bei Ausgangstitern von 1 : 8-128 überdauern die Antikörper in niedrigen Werten mindestens für eine Zeit von 11 Monaten, wobei die Tiere auf ein weiteres Impfen anamnestic reagieren. Vakzinierter Tiere sind gegen massive Infektion mit virulentem Virus geschützt.

Aujezskysches Virus; avirulenter Klon; Rindvieh; Antikörperbildung; Widerstandsfähigkeit gegen Infektion

Adresa autorů:

Doc. MVDr. A. Žuffa, CSc., MVDr. J. Salaj, Bioveta, Nitra

ÚČINEK ACTH NA KONCENTRACI KYSELINY ASKORBOVÉ V NADLEDVINÁCH A V JÁTRECH BĚHEM VÝVOJE SELAT

M. Dvořák

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

DVOŘÁK M. Účinek ACTH na koncentraci kyseliny askorbové v nadledvinách a v játrech během vývoje selat. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 211-216, 1972.

Intramuskulární injekce ACTH vyvolala u selat starých 2, 10, 29 až 41 a 50 až 62 dní snížení koncentrace kyseliny askorbové (KA) v nadledvinách o 21 až 32 %. Bylo to zjištěno při působení depotního ACTH za čtyři hodiny. Obdobný výsledek byl získán za dvě hodiny při použití ACTH s neprotrahovaným účinkem. Nejmenší deplece KA byla zaznamenána u selat dva dny po narození. Stimulace adrenálního kortexu se neprojevila průkazně změnou koncentrací KA v játrech. Účinek depotního ACTH se projevil s výjimkou selat nejmladších také mírným zvýšením relativní váhy nadledvin.

adrenokortikální funkce; stres; váha nadledvin; eosinopénie

Snad žádné jiné látky nutričního charakteru nebylo věnováno ve vztahu s nadledvinami tolik pozornosti, jako kyselině askorbové (KA). Podnět ke studiím jejího fyziologického významu dalo zjištění, že tato endokrinní žláza má vysokou koncentraci KA, která se specifickým účinkem adrenokortikotropního hormonu (ACTH) výrazně snižuje (Sayers a Sayersová 1948, Sayers a kol. 1948, Clayman a kol. 1970). Poznatky o vztazích KA k adrenokortikální funkci shrnuli Morgan (1951), Schreiber (1955), Goldsmith (1961) a je jim věnována pozornost i v současné době (Šabalov a Cybulkin 1967, Baker 1967, De Nicola a kol. 1968, Perek a Kendler 1969). Vzájemný vztah steroidogeneze a deplece KA však zůstává stále neobjasněn.

Při stresu je zvýšená funkce systému hypofýza — kůra nadledvin prokazatelná úbytkem KA v nadledvinách. Její stanovení je nejčastěji používaným nepřímým kritériem zvýšené sekrece kortikosteroidů, na jehož základě byly vypracovány metody kvantitativního měření ACTH (Sayers a kol. 1948, Brodish a Long 1960), i když mechanismus deplece KA není vždy kvantitativně těsně spjatý s vylučováním adrenálních kortikoidů (Lipscomb a Nelson 1960, Rerup a Hedner 1961). Všeobecně je uváděno, že koncentrace je v nadledvinách při stresu redukována a opět upravena po odeznění zátěže nebo po adaptaci na neobvyklé požadavky. Není tomu tak však u všech živočišných druhů a za všech okolností (Schwartz a Kling 1960, Slater 1962, Robinson a Reiter 1967, Freeman 1967, Greenman a kol. 1967). Jsou také údaje o rozdílech působených věkem (Ingle 1951, Klingera a Ankermann 1965, Geber a kol. 1966).

Předložená studie si vzala za úkol zjistit, zda se u selat projevuje zvýšená adrenokortikální činnost deplecí KA v nadledvinách, zda neexistují věkové rozdíly a zvláště pak, zda již u nejmladších selat je kůra nadledvin funkčně zralá z hlediska odpovědi na ACTH i na působící stresory. Tyto poznatky mohou mít základní význam pro použitelnost uvedeného deplečního jevu k diagnostice stresu.

MATERIÁL A METODY

Bylo studováno působení exogenního ACTH na koncentraci KA v nadledvinách selat čtyř věkových kategorií: ve stáří 2, 10, 29 až 41 dní a u odstavených selat starých 50 až 62 dní. *Corticotrophin retard* Spofa byl injikován i. m. v 7 hodin ráno v jednotné dávce 20 j. pěti až šesti zvířatům každé věkové kategorie. Spolu se stejným počtem neošetřených kontrol byla selata vykrvena za čtyři hodiny po aplikaci. *Corticotrophin* Spofa (s neprotrahovaným účinkem) byl injikován i. m. v 7 hodin ráno v dávce 25 j. pěti selatům starým 29 až 41 dní, která byla vykrvena spolu se šesti kontrolními za dvě hodiny.

Při začátku a při konci pokusu byl zjišťován počet cirkulujících eosinofilních granulocytů (Eo) metodou podle Pirališviliho (1962) odběrem krve z ušní vény. V uvedenou dobu byla selata po zvážení usmrcena dekapitací. Nadledviny byly zváženy a zpracovány s játry do dvou hodin. Celková KA byla stanovena metodou v principu podle Roe a Kuethera (1934) s modifikací v použití mědi podle Besseye a kol. (1947): 0,5 g tkáně bylo homogenizováno a extrahováno v 4% kyselině trichloroctové v poměru 1 : 50 u jater a 1 : 100 u nadledvin. Rozdíly průměrů byly statisticky hodnoceny *t* testem.

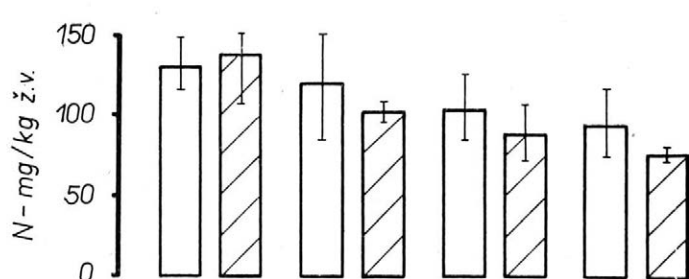
VÝSLEDKY

Za čtyři hodiny po aplikaci depotního ACTH byly nadledviny při vyjádření poměrem k váze těla u pokusných skupin, s výjimkou selat dvoudenních, mírně těžší (obr. 1). Rozdíly mezi ošetřenými a kontrolními zvířaty těchto věkových kategorií nebyly statisticky významné. Průkazný ($P = 0,01$) však byl rozdíl v poměru váhy nadledvin k váze těla mezi nejmladšími selaty a následujícími věkovými kategoriemi, se zřetelným trendem snižování až k nejstarším.

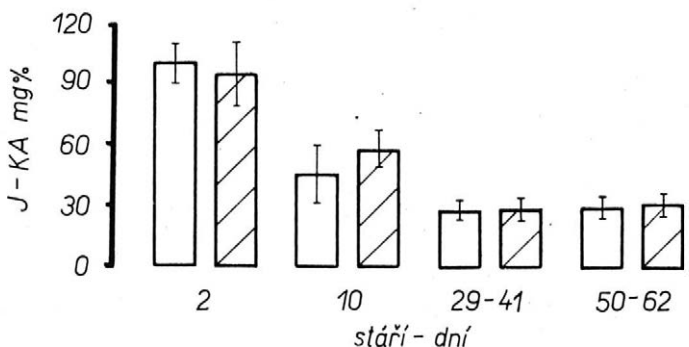
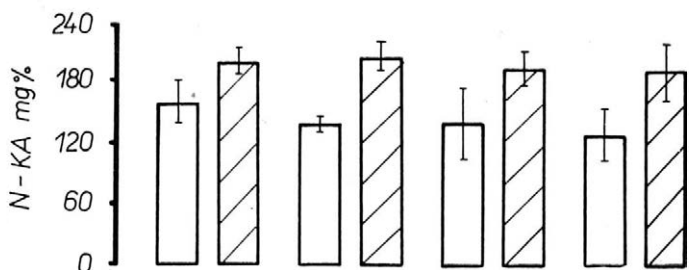
V koncentraci KA v nadledvinách věkové rozdíly nebyly; zvláště u kontrolních selat různého stáří byly hladiny téměř stejné. U všech selat, jimž bylo aplikováno ACTH, bylo zjištěno průkazné ($P = 0,01$ nebo $0,05$) snížení hladin, a to ve srovnání s neošetřenými o 21 % (2. den) až 32 % (10. a 50. až 62. den). Na koncentraci KA v játrech neměl exogenní ACTH průkazný účinek, s výjimkou nejmladších selat však byla její hladina mírně nižší než u kontrol. Průkazné rozdíly ($P = 0,01$) byly mezi selaty dva dny po narození a selaty staršími, u kontrol také mezi desetidenními a následujícími věkovými kategoriemi.

Rovněž po aplikaci ACTH s neprotrahovaným účinkem u selat starých 29 až 41 dní, vykrvených za dvě hodiny po injekci, došlo k depleci KA v nadledvinách (131 ± 10 mg/100 g), a to ve srovnání s kontrolami (194 ± 16 mg/190 g) o 32 %. Nebyly zjištěny změny v poměru váhy nadledvin k váze těla (90 ± 27 proti 89 ± 18 mg/kg ž. v.) ani změny v koncentraci KA v játrech.

Sledovaný počet Eo v periferní krvi ukázal výraznou redukci, většinou až k nulovým hodnotám, zvýšení adrenokortikální aktivity u všech pokusných selat -- u dvoudenních klesl z výchozích 20/cm za čtyři hodiny na 2/cm. U kontrolních zvířat se hladina Eo příliš neměnila, jen v ojedinělých případech se snížila pod 50 % výchozí hodnoty.



1. Poměr váhy nadledvin k váze těla, koncentrace kyseliny askorbové (KA), v nadledvinách (N), v játrech (J) u selat čtyři hodiny po aplikaci depotního ACTH a u selat kontrolních (šrafované sloupce)



DISKUSE

Z výsledků vyplývá, že selata sající i odstavená jsou ve sledovaném věku schopna odpovídat na působení ACTH snížením hladiny KA v nadledvinách. To je ve smyslu poznatků Sayerse a kol. (1948), Brodishe a Longa (1960), Rerupa a Hednera (1961) a dalších příznakem zvýšené sekrece kortikosteroidů. Znamená to, že úbytku KA v nadledvinách lze u selat použít jako nepřímého kritéria zvýšené adrenokortikální aktivity. Není při tom nutné přihlížet k nepatrným věkovým rozdílům v koncentraci KA v nadledvinách. Zjištěný stupeň deplece je téměř stejný, jako za jednu hodinu po aplikaci ACTH telatům (Dvořák a kol. 1970a). Je poněkud nižší než udávají Seyers a kol. (1948), Brodish a Long (1960), Rerup a Hedner (1961) u krys. Není vyloučeno, že nebyla vystižena doba maximální deplece, neboť po určité době se koncentrace KA v nadledvinách vrací opět k základním hodnotám (Sayers a Sayersová 1948). Z komparativního hlediska je zajímavé, že u novorozenečích krys nebyla při použití deplece KA v nadledvinách

jako kritéria adrenokortikální aktivity zjištěna odpověď na ACTH (Leeman 1963 — cit. podle Levine a kol. 1967).

Dalším významným znakem zvýšené produkce kortikosteroidů je zvětšení nadledvin (Selye 1946), které se u selat ve stáří 10 dnů a starších začalo zřetelně projevovat za čtyři hodiny adrenokortikální stimulace. Otázku, proč se tento příznak neprojevil také u selat dvoudenních, by snad bylo možné alespoň částečně vysvětlit relativně vysokou váhou nadledvin již za „klidových“ situací, kdy jsou schopna produkovat velká kvanta 17-OHCS (Dvořák 1967), k čemuž je u starších třeba hypertrofie žlázy. Že u nejmladších pokusných selat byla kůra nadledvin skutečně stimulována ke zvýšené sekreci, ukazuje nejen snížená hladina KA, ale i snížený počet cirkulujících Eo. O schopnosti nejmladších selat tvořit ve zvýšené míře kortikosteroidy svědčí také poznatky získané po stimulaci s ACTH *in vitro* (Dvořák a kol. 1970b).

Věkové rozdíly zjištěné u váhy nadledvin v poměru k váze těla i v koncentraci KA v játrech, ne však v nadledvinách, potvrzují poznatky dříve uvedené (Dvořák 1966).

Literatura

- BAKER E. M., 1967, Vitamin C requirements in stress. *Am. J. clin. Nutr.* 20 : 583-590.
- BESSEY O. A., LOWRY O. H., BROCK M. J., 1947, The quantitative determination of ascorbic acid in small amounts of white blood cells and platelets. *J. biol. Chem.* 168 : 197-205.
- BRODISH A., LONG C. N. H., 1960, Characteristics of the adrenal ascorbic acid response to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in the rat. *Endocrinology* 66 : 149-159.
- CLAYMAN M., TSANG D., DE NICOLA A. F., JOHNSTONE R. M., 1970, Specificity of action of adrenocorticotrophin *in vitro* on ascorbate transport in rat adrenal glands. *Biochem. J.* 118 : 283-289.
- DE NICOLA A. F., CLAYMAN M., JOHNSTONE R. M., 1968, Hormonal control of ascorbic acid transport in rat adrenal glands. *Endocrinology* 82 : 436-446.
- DVOŘÁK M., 1966, Hladiny kyseliny askorbové v nadledvinách a játrech selat různého stáří a jejich vztah k zásobám vitaminu A. *Vet. Med. (Praha)* 11 : 371-377.
- DVOŘÁK M., 1967, 17-hydroxycorticosteroid levels of blood plasma and the *in vitro* activity of the adrenal cortex in piglets of various ages. *Acta Univ. Agric., Fac. vet. (Brno)* 36 : 403-407.
- DVOŘÁK M., GILKA F., PATKA J., 1970a, Postmortální posouzení adrenokortikální aktivity u telat v přirozených a experimentálních podmínkách. *Vet. Med. (Praha)* 15 : 53-62.
- DVOŘÁK M. a kol., 1970b, Stresové reakce u sajících a odstavených selat. Závěrečná zpráva výzk. úkolu č. VIII-1-1/19, VÚVL Brno : 88 s.
- FREEMAN B. M., 1967, Effect of stress on the ascorbic acid content of the adrenal gland of *gallus domesticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 23 : 303-305.
- GEBER W. F., ANDERSON T. A., DYNE B. VAN, 1966, Age factors in the response of the albino rat to emotional and muscular stresses. *Growth* 30 : 87-97.
- GOLDSMITH G. A., 1961, Human requirements for vitamin C and its use in clinical medicine. *Ann. New York Ac. Sci.* 92 : 230-245.
- GREENMAN D. L., WHITLEY L. S., ZARROW M. X., 1967, Ascorbic acid depletion and corticosterone production in the avian adrenal gland. *Gen. comp. Endocrinol.* 9 : 422-427.
- INGLE D. J., 1951, Parameters of metabolic problems. *Rec. Progr. Horm. Res.* 6 : 159-194.
- KLINGER W., ANKERMAN H., 1965, Die L-Ascorbinsäure-Konzentration in den Organen von Ratten unterschiedlichen Alters und Geschlechtes vor und nach der Behandlung mit Barbital. *Acta biol. med. german.* 14 : 764-773.
- LEVINE S., GLICK D., NAKANE P. K., 1967, Adrenal and plasma corticosterone and vitamin A in rat adrenal glands during postnatal development. *Endocrinology* 80 : 910-914.

- LIPSCOMB H. S., DON NELSON H., 1960, Dynamic changes in ascorbic acid and corticosteroids in adrenal vein blood after ACTH. *Endocrinology* 66:144-146.
- MORGAN A. F., 1951, The effect of vitamin deficiencies on adrenocortical function. *Vitamins Horm.* 9:151-212.
- PEREK M., KENDLER J., 1969, The effect of ascorbic acid on adrenal activity during vitamin A and riboflavin deficiencies in chicks. (Adrenal activity in vitamin deficiency.) *Acta endocr.* 61:203-208.
- PIRALIŠVILI I. S., 1962, K metodice početa eozinofilov v periferičeskoj krvi. *Labor. Delo* 8, 3:20-22.
- RERUP C., HEDNER P., 1961, On the assay of corticotrophin: Comparison of the plasma corticosteroid and adrenal ascorbic acid response. *Acta endocr.* 38:220-235.
- ROBINSON P. F., REITER R. J., 1967, The adrenal response of hamsters, gerbils and rats to exogenous corticotrophin or unilateral adrenalectomy. *Acta endocr.* 54:257-262.
- ROE J. H., KUETHER C. A., 1963, The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J. biol. Chem.* 147:399-407.
- SAYERS G., SAYERS M. A., 1948, The pituitary-adrenal system. *Rec. Progr. Horm. Res.* 2:81-115.
- SAYERS M. A., SAYERS G., WOODBURY L. A., 1948, The assay of adrenocorticotrophic hormone by the adrenal ascorbic acid-depletion method. *Endocrinology* 42:379-393.
- SELYE H., 1946, The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. clin. Endocr.* 6:117-230.
- SCHREIBER V., 1955, Vztahy mezi kyselinou askorbovou a korou nadledvin. *Čas. lék. čes.* 94:514-519.
- SCHWARTZ N. B., KLING A., 1960, Stress-induced adrenal ascorbic acid depletion in the cat. *Endocrinology* 66:308-310.
- SLATER G. G., 1962, Adrenal ascorbic acid, plasma and adrenal corticoid response to fasting in young rats. *Endocrinology* 70:18-23.
- ŠABALOV N. P., CYBULKIN E. K., 1967, Gormony kory nadpočecnikov i ustojčivost životnych raznogo vozrasta k asfiksii. *Bjull. exp. Biol. Med.* 63, 8:23-26.

Došlo dne 12. 5. 1971

ДВОРЖАК М. (Научно-исследовательский ветеринарный институт, Брно, Чехословакия). Действие АСТН на концентрацию аскорбиновой кислоты в надпочечниках и печени в период развития поросят. *Vet. Med. (Praha)* 17 (4):211-216, 1972.

Внутримышечное впрыскивание АСТН у поросят 2, 10, 29—41 и 50—62-дневного возраста понижало концентрацию аскорбиновой кислоты (АК) в надпочечниках на 21—32%. Это было установлено при воздействии скопленного АСТН в течение 4 часов. Аналогичный результат был получен через 2 часа при применении АСТН с кратковременным действием. Минимальное отсутствие АК было отмечено у поросят 2-дневного возраста. Стимуляция адrenaльного кортекса не проявилась достоверно измененной концентрацией АК в печени. Действие скопленного АСТН также проявилось, за исключением самых молодых поросят, незначительным повышением относительного веса надпочечников.

адренокортикальная функция; стресс; вес надпочечников; эозинопения

DVOŘÁK M. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). *Effect of ACTH on Ascorbic Acid Concentration in Suprarenal Glands and Liver during Piglet Development.* *Vet. Med. (Praha)* 17 (4):211-216, 1972.

An intramuscular ACTH injection brought about a decrease of the ascorbic acid (AA) concentration in suprarenal glands by 21—32% in 2, 10, 29—41 and 50—62 days old piglets. Under the influence of depot ACTH this was determined in 4 hours. A similar results was achieved in 2 hours when ACTH with an unprotracted effect was used. The lowest AA depletion was noted in piglets 2 days after birth. The adrenal cortex stimulation did not show significantly in a changed

AA concentration in the liver. With the exception of the youngest piglets the effect of depot ACTH showed also in a moderate increase of the relative suprarenal glands weight.

adrenocortical function; stress; suprarenal glands weight; eosinopenia

DVOŘÁK M. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Effekt des ACTH auf die Ascorbinsäurekonzentration in der Nebenniere und der Leber im Verlaufe der Ferkelentwicklung.* Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 211-216, 1972.

Eine intramuskuläre ACTH-Injektion rief bei 2, 10, 29—41 und 50—60 Tage alten Ferkeln eine Herabsetzung der Ascorbinsäure (AS) in der Nebenniere um 21—32 % hervor. Es wurde bei der Wirkung des Depot-ACTH nach 4 Stunden ermittelt. Ein ähnliches Ergebnis wurde nach 2 Stunden bei der Benützung von ACTH mit unprotrahierter Wirkung erzielt. Die geringste AS-Depletion wurde bei Ferkeln 2 Tage nach der Geburt ermittelt. Die Stimulation des Adrenalkortexes zeigte sich nicht signifikant in einer veränderten AS-Konzentration in der Leber. Mit der Ausnahme der jüngsten Ferkel kam der Effekt des Depot-ACTH auch in einer mäßigen Erhöhung des relativen Nebennierengewichtes zum Vorschein.

adrenokortikale Funktion; Stress; Nebennierengewicht; Eosinopönie

Adresa autora:

MVDr. M. Dvořák, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno-Medlánky

HISTOLOGICKÉ A HISTOCHEMICKÉ ZMENY V ENDOMETRIU KRÁV PRI NIEKTORÝCH OVARIÁLNYCH PORUCHÁCH

F. Schvarc

Vysoká škola veterinárska, katedra pôrodnictva, gynekológie a umelej inseminácie, Košice

SCHVARC F. *Histologické a histochemické zmeny v endometriu kráv pri niektorých ovariálnych poruchách.* Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 217-244, 1972.

Biopsiou endometria a vyšetrením *post mortem* boli podrobené histologickej a histochemickej analýze vzorky endometria u kráv pri nasledujúcich poruchách ovárií: folikulárne a luteálne cysty, *corpus luteum persistens*, žlté telieska kombinované cystami a pri hypofunkcii ovárií. Z celkového počtu 125 vyšetrených vzoriek cystózne vaječníky vykazovali po stránke morfológie endometria veľmi nepravidelný obraz. Časté boli i príznaky endometritídy bez klinických zmien. U cyst žltého telieska bola morfológická štruktúra takmer jednoduchá, a to rozvinutá fáza sekrécie. U vaječníkov, kde boli žlté telieska kombinované cystami, bol nález taktiež netypický. Vyznačoval sa najmä striedaním rozvinutej sekrécnej fázy s degeneratívnymi zmenami uterinných žliazok. Posledná skupina — hypofunkčné ovária — vykazovala dosť vyrovnaný mikroskopický obraz, vyznačujúci sa najmä zmenami na povrchovom epiteli a na uterinných žľazách. Histologické a histochemické vyšetrenia vzoriek endometria pri ovariálnych poruchách umožňujú presnejšie stanovenie diagnózy a lepšie využitie hormonálnej terapie.

ovariálne poruchy; histológia a histochemia endometria; krava

Poruchy vaječníkov u kráv sú známe už desiatky rokov (Z a n g e r 1859 — cit. B ö l c s h á z y 1960). Ostáva ešte dnes mnoho nevyjasnených otázok, najmä čo sa týka genézy a terapie. Veľký pokrok možno zaznamenať zvlášť od tých čias, keď sa začali choroby vaječníkov hodnotiť zo širšieho aspektu s ohľadom na prostredie, výživu a úžitkovosť (C s e h 1969).

O činnosti vaječníkov získavame obraz jednak podľa pohlavných funkcií zvierata, jednak podľa palpatorického nálezu na vnútorných pohlavných orgánoch. Už v minulosti mnohí autori, ako sú Székely a Dózsa (1956), Vě ž n í k (1957), S c h v a r c (1961), poukázali na možnosti posudzovania pohlavnej činnosti kráv na základe biopsie endometria. Táto nová metóda vo veterinárnej praxi za svojej krátkej existencie prešla mnohými analýzami. Pri jej hodnotení boli opísané jej kladné a záporné stránky, no napriek tomu uvedení autori doporučajú biopsiu endometria pri rôznych poruchách neurohumorálneho riadenia pohlavnej činnosti.

Na základe doterajších literárnych údajov možno histologické a histochemické vyšetrenia endometria pomocou biopsie alebo vyšetrenia *post mortem* zaradiť do niekoľkých skupín.

V prvom rade sú to práce Skjervena (1956), Vollmerhausa (1957), Vě ž n í k a (1960) a ďalších, ktorí histologické štúdium robili za účelom stanovenia fázy pohlavného cyklu. Tieto práce v mnohom ohľade prispeli

na poznanie zmien v endometriu počas jednotlivých fáz pohlavného cyklu a boli základom pre ďalšie morfológické štúdium najmä pri patologických zmenách na endometriu.

K podobným výsledkom sa dopracoval K j u b a r (1964), ktorý referuje o morfológickej štruktúre endometria od pôrodu do ukončenia pueréria. Táto práca, ako aj práca S c h u l z a a G r u n e r t a (1964) prispeli v značnej miere na poznanie involučných zmien na endometriu u kráv.

Početná skupina autorov, ako sú D e i n i n g e r (1956), B r o d a u f (1957), S c h n i d e r (1958), Š p a č e k (1963), P o p e s c u a kol. (1968) a mnohí ďalší, sa zaoberali diagnostikou chronických endometritíd pomocou endometriálnej biopsie. Keďže klinické metódy stanovenia diagnózy chronických endometritíd u kráv sú pomerne ťažké a nepresné, boli tieto práce prínosom pre objektívne posúdenie zmien na endometriu. Otázka však zostáva i naďalej otvorená v tom smere, či taký malý okrskok sliznice, ako sa získava pri biopsii, je dostatočný pre posúdenie všetkých zmien na endometriu. Je však isté, ako na to poukazujú všetci uvedení autori, že endometriálnu biopsiu možno objektívne využiť len vtedy, keď má byť doplnkom klinického vyšetrenia.

Najnovšie práce v tomto smere sú venované štúdiu morfológickej štruktúry endometria u kráv pri rôznych ovariálnych poruchách neurohumorálneho pôvodu. Cieľom týchto prác je sledovanie zmien v endometriu, ktoré pomerne verne odzrkadľujú hĺbku neuroendokrinnnej poruchy pohlavnej činnosti a v mnohom prispievajú k správne odhadu prognózy. Tak napr. M j u j u r s e p p (1968) považuje histologické štúdium endometria pri tzv. bezsymptomatickej sterilite za veľmi dôležité. Tento autor diagnostikoval endometriálnou biopsiou v týchto prípadoch chronické endometritídy, atrofiu uterinných žliazok, nekrobiózu alebo ich nekrozu. Tieto patologicko-histologické zmeny môžu byť príčinou odumretia embrya. Podobné výsledky uvádza aj B o g d a n a kol. (1967).

Ďalej sú cenné práce, ktoré študujú endometrium po stránke histologickej, ale najmä histochemickej, hlavne pri výskyte rôznych cystózných útvarov na vaječníkoch. Treba spomenúť prácu M a r i n o v a a L o v e l l a (1968), ktorí sledovali najmä sekrečnú schopnosť buniek endometria, ako aj W a g n e r a a H a n s e l a (1969), ktorí obohatili literatúru najmä o regresívne zmeny na endometriu kráv v popôrodnom období za súčasného sledovania rastu folikulov; o podobných výsledkoch referuje tiež P e t r o v (1967).

Pomerne obtiažne je určenie etiológie pri cystózných vaječníkoch, pretože zatiaľ nebola venovaná dostatočná pozornosť najmä luteálnym cystám. V tomto smere sú cenné pozorovania H o u d a s a (1968), ktorý referuje o histologickom štúdiu endometria pri luteálnych cystách. Luteálne cysty študoval aj D i e t e r (1969).

Hodne prispievajú k rozpoznaní zmien na uterinných žliazkach údaje W a c h s m u t h a (1968), týkajúce sa grafickej rekonštrukcie zmien dĺžky uterinných žliaz u kráv, jeho výsledky upresňujú diagnózu pri rôznych ovariálnych poruchách. Jednou z kritérií morfológického štúdia endometria je variácia dĺžky uterinných žliaz v závislosti na fáze pohlavného cyklu.

MATERIÁL A METÓDY

Histologické a histochemické štúdium endometria sme robili u 125 kusov kráv s rôznymi poruchami na vaječníkoch. Materiál sme rozdelili jednak podľa spôsobu získavania vzoriek pre účely vyšetrenia, jednak podľa nálezov na vaječníkoch.

Časť vzorkov — 47 kusov — bolo získaných endometriálnou biopsiou od kráv, ktoré boli dlhší čas v pozorovaní a mali pomerne presnú anamnézu.

Ďalšia časť vzorkov bola získaná *post mortem*, pri tých nebola presná anamnéza, ale bol známy presný patologicko-anatomický ohraz na pohlavných orgánoch.

Podľa nálezov na vaječníkoch bol materiál rozdelený do štyroch skupín:

V prvej skupine bolo 30 kráv s cystóznymi vaječníkmi, u ktorých sme v 12 prípadoch odobrali vzorky biopsiou endometria, ostatné boli získané *post mortem*. Cysty boli rôznej veľkosti od priemeru 1,5 cm a do veľkosti detskej hlavy. U bioptického materiálu všetky cysty boli aktívne s typickými klinickými príznakmi. Folikulárne a luteálne cysty boli v rovnakom pomere. V druhej skupine bolo 39 kráv. V 11 prípadoch bola robená biopsia a ostatné vzorky boli získané na bitútku. Išlo o perzistujúce žlté telieska so všetkými klinickými prejavmi. V tretej skupine bolo 27 prípadov, u ktorých sme v 14 prípadoch previedli biopsiu a ostatné vzorky sme získali *post mortem*. V tejto skupine išlo o kombináciu *corpus luteum* s cystóznymi útvarmi na vaječníkoch. Dozrievajúce folikuly sme vylúčili z vyšetrenia, išlo v každom prípade o cysty. V poslednej skupine bolo 29 kráv, ktorých vaječníky boli hypofunkčné. V 10 prípadoch sme odobrali vzorky biopsiou endometria a ostatné vzorky sme získali na bitútku. Vaječníky boli malé asi ako slivková kôstka. Povrch bol mierne hrbolatý so známami zachovania parenchymu.

Biopsiu endometria sme robili metódou opísanou v predošlých prácach (Schvarc 1961).

Materiály sme spracovali ihneď po odbere vzoriek. Pri každej excízii bola robená bežná histologická analýza, vzorky sme fixovali roztokom „Susa“ a rezy sme farbili metódou HE. Vzorky k histochemickej analýze sme fixovali schladeným acetónom alebo alkoholom. Histochemické reakcie sme robili na glykogén, alkalickú fosfatázu a na polysacharidy.

Pri hodnotení histologických preparátov sme sa predovšetkým zamerali na zmeny povrchového epitelu, na bunečnú štruktúru subepiteliálnej vrstvy a najmä na morfológiu uterinných žliazok, ich počet, umiestnenie, veľkosť, smer vývodov a zloženia, ako aj na celkovú bunečnú skladbu.

Pri hodnotení histochemických reakcií sme sa zamerali na lokalizáciu uvedených komponentov, ako aj na ich kvalitu.

VÝSLEDKY

Histologický nález na endometriu pri ovariálnych cystách nie je jednoznačný. Z vyšetreného materiálu pripadá na ovariálne cysty 24,0 %, z toho asi rovnakým dielom sa podelali cysty folikulárne a luteinové.

1. OVARIÁLNE CYSTY

a) Folikulárne. Nález pri folikulárnych cystách pripomínal väčšinou proliferáciu fázu na endometriu (obr. 1), hoci mnohokrát bol porušený najmä skladbou povrchového epitelu a výstielkového epitelu uterinných žliazok. Epitel sa skladal z jedného radu nízkych kubických buniek. Jadrá boli tmavo zfarbené a nachádzali sa tesne nad bazálnou membránou, pričom epitel robil dojem nízkej tmavej čiary.

V subepiteli sa nachádzali početné lymfocytárne infiltrácie, vrstva málobunečnej infiltrácie pod epitelom bola tenká.

Uterinné žliazky boli pomerne malé a boli husto roztrúsené v celej mukóze, luminizácia bola pravidelná a občas sa vyskytovali viac dilatované žliazky bez vývodných ciest.

Takýto nález bol typický pre skupinu kráv s aktívnymi cystami, kde vzorky boli získané biopsiou. Časť vzoriek, najmä získaných na bitúnku, vykazoval nález typický pre chronickú endometritídu. Tento nález okrem degeneratívnych zmien na povrchovom a výstelkovom epiteli žliazok bol reprezentovaný najmä zmožením pojivového tkaniva aj v hlbších vrstvách mukózy početnými krvnými výronmi v subepiteli a desquamáciou povrchového epitelu (obr. 2).

Histochemickým vyšetrením sme pozorovali najmä zmeny v aktivite alkalicko-fosfatázy. Táto sa lokalizovala prevažne v epiteliálnych bunkách, hlavne v nadjadernej zóne. Výrazná bola aj v stróme a hlavne v stenách krvných ciev.

Glykogén bol stanovený konštantne v endometriu v podobe zrniek, no v podstatne menšom množstve ako pri normálnej proliferatívnej fáze endometria.

Ostatné PAS pozitívne látky mali podobnú aktivitu ako glykogén.

b) **Luteinové cysty.** Pri luteinových cystách bol histologický nález typický pre počiatočnú sekrečnú fázu. Uterinné žliazky boli dobre rozvinuté, siahali tesne pod bazálnu membránu so špirálovite stočenými vývodmi.

Histochemický nález bol typický pre sekrečnú fázu až na alkalickú fosfatázu, ktorá vykazovala silnejšiu aktivitu.

2. PERZISTUJÚCE ŽLTÉ TELIESKO

Z vyšetreného materiálu bolo *corpus luteum persistens* zastúpené v 32 %, z čoho 69 % bolo lokalizovaných na pravom vaječníku.

Mikroskopický obraz na endometriu bol typický pre sekrečnú fázu (obr. 3). Povrchový epitel sa skladal z dvoch i viac radov cylindrických buniek. Jadrá boli excentricky uložené a nadjaderná zóna bola vyplnená priesvitnou hmotou. Početné bunky epitelu secernovali typickou holokrinnou sekréciou. V subepiteliálnej vrstve roztrúsené špirálovite stočené uterinné žliazky s vývodmi siahali až na povrch epitelu. Pri kolmých histologických rezoch žliazky zaujímali kolmý smer na povrch sliznice. Bunky v stróme neboli zmožené, len ojedinele sme pozorovali atrofiu uterinných žliazok. V týchto prípadoch boli žliazky malé, ale početne rozvinuté.

V niektorých prípadoch sme zistili tiež pomerne silne dilatované uterinné žliazky v blízkosti bazálnej membrány, ktoré boli podobné ako uterinné žliazky pri gravidite (obr. 4).

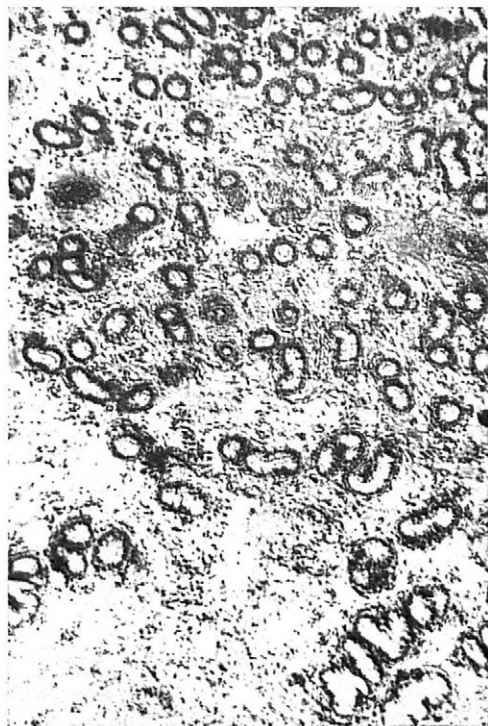
Histochemickými vyšetreniami sme stanovili zníženú aktivitu alkalicko-fosfatázy, zvlášť v povrchovom epiteli. Aktivita PAS pozitívnych látok, ako aj glykogénu, najmä v epiteli žliaz, a vývodných cestách, bola pomerne silná. Podobná aktivita bola aj v subepiteliálnej vrstve a v hlbších partiách strómy.

V prípadoch so silne dilatovanými uterinnými žliazkami bola aktivita polysacharidov veľmi nízka, hoci v povrchovom epiteli bola priemerná.

3. KOMBINÁCIA OVARIÁLNYCH CÝST A ŽLTÝCH TELIESOK

Z celkového počtu vyšetrených vzoriek sa u 21 % vyskytovali žlté telieska kombinované s cystóznymi útvarmi. Išlo o cysty, ktoré sa lokalizovali buď na báze žltého telieska, alebo to boli pomerne veľké viackomorové cysty. V každom prípade boli vylúčené folikuly.

Histologický obraz bol veľmi rozmanitý, na endometriu sa striedali fázy proliferácie a sekrécie, ale aj niektoré degeneratívne zmeny.



1. Endometrium kravy pri folikulárnej cyste ovária. Zmnoženie uterinných žliazok, výstelkový epitel nízky, jadrá tmavo sfarbené. Farbenie HE, zväčšenie 60 X

2. Histologický nález pri chronickej endometritíde, degeneratívne zmeny uterinných žliazok, zmnoženie strómy, silná vaskularizácia. Farbenie HE, zväčšenie 60 X

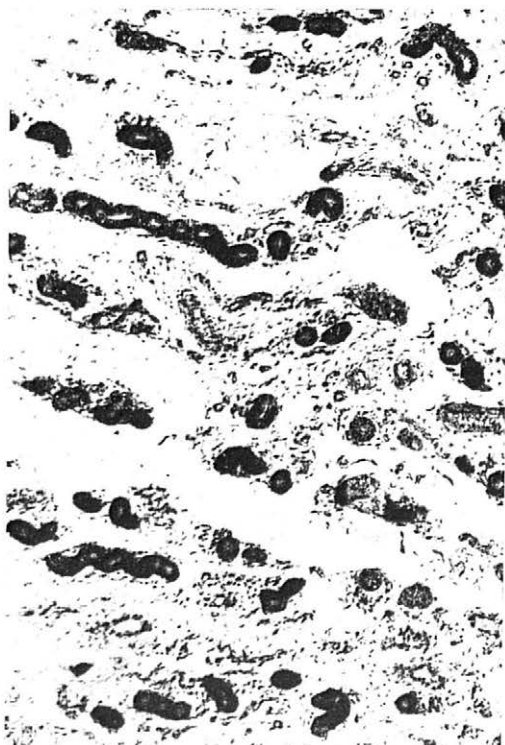




3. Histologický nález pri výskyte perzistujúceho žltého telieska na ovárii. Typická sekrečná fáza. Farbenie HE, zväčšenie 100X



4. Porušená sekrečná fáza na endometriu pri *corpus luteum persistens*, lúmeny uterinných žliazok sú silne dilatované, siahajú takmer pod bazálnu membranu. Farbenie HE, zväčšenie 60X



5 Typické príznaky hypofunkcie vaječníkov na endometriu. Farbenie HE, zväčšenie 60X

Pri cystách žltého telieska, ako aj pri lokalizácii cýst na báze žltého telieska, bol nález jednoznačný. Tak histologicky ako aj histochemicky bola potvrdená rozvinutá sekrečná fáza. Uterinné žliazky však boli menšie ako vo fáze normálneho pohlavného cyklu, no ich vývody siahali až po povrchový epitel, málobunečná infiltrácia v subepiteli bola veľmi tenká, vaskularizácia strómy bola tiež slabá.

V prípadoch, kde sa cysty nachádzali mimo žltého telieska, bol nález veľmi rozdielny. Vyskytovali sa aj také prípady, pri ktorých sa dalo predpokladať podľa histologických zmien i na endometritídu.

4. HYPOFUNKČNÉ OVÁRIA

Do poslednej skupiny boli zaradené hypofunkčné vaječníky, ktoré tvoria 23 % z vyšetreného materiálu.

Histologický nález možno rozdeliť do dvoch podskupín:

a) V prvej boli vaječníky iba zmenšené, ale so zachovalou štruktúrou a primeraným histologickým nálezom (obr. 5). Uterinné žliazky boli malé, v malom počte a boli roztrúsené v celej sliznici. Obraz bol charakteristický pre regresiu endometria v pohlavnom cykle.

b) Do druhej podskupiny sme zaradili zmeny irreverzibilného charakteru. Povrchový epitel sa skladal z jedného radu nízkych buniek s tmavo sfarbenými jadrami, uloženými tesne nad bazálnou membránou. V subepiteliálnej vrstve sme pozorovali celkom tenkú málobunečnú infiltráciu, takmer sme nenachádzali žliazky, ale silné zmnoženie pojivového tkaniva, ktoré siahalo až pod bazálnu membránu povrchového epitelu.

V povrchovom epiteli bola silná aktivita alkalickéj fosfatázy, polysacharidy ako aj glykogén sa nachádzal jedine v stróme.

DISKUSIA

Pokúsili sme sa histologickou a histochemickou analýzou spresniť diagnózu pri rôznych poruchách na vaječníkoch u kráv. Uvedené poruchy na vaječníkoch boli neuro-endokrinného pôvodu a vyznačovali sa takými zmenami na vaječníkoch, ktoré sa dajú rektálne zistiť, ale z hľadiska prognózy a terapie sú často infaustné.

Frekvencia jednotlivých porúch na vaječníkoch je udávaná len z vyšetreného materiálu, ktorý bol tendenčne vybraný, teda nevystihuje celkový výskyt uvedených porúch u kráv. Napriek tomu možno konštatovať, že najčastejšími poruchami na vaječníkoch u kráv sú patologické žlté telieska, ich cysty, alebo žlté telieska kombinované s cystóznymi útvarmi. Tieto naše pozorovania potvrdzuje aj práca Houdasa (1968), ktorá poukazuje na význam luteinových cýst a upozorňuje, že doteraz nebola venovaná tejto otázke dostatočná pozornosť.

Podobne ako uvádzajú Széky a Dózsa (1956), Věžník (1957), Schneider (1958), i naše výsledky potvrdzujú použiteľnosť endometriálnej biopsie pre diagnostiku porúch plodnosti u kráv; treba sa pritom vyvarovať rôznym artefaktom, ktoré nás môžu dezorientovať pri histologickej analýze.

Výsledky histologického a histochemického vyšetrenia pri jednotlivých poruchách vaječníkov nie sú jednoznačné a varujú podľa hĺbky procesu. Prikláňame sa k výsledkom starších prác, ako sú práce Grunerta (1955), Deininger (1956), Brodaufa (1957), ale aj k novším údajom od Bogdana a kol. (1968), že biopsiu endometria možno využiť len vtedy, ak je vhodným doplnkom klinického vyšetrenia. Týka sa to najmä našich výsledkov

v skupine cystózných útvarov na vaječníkoch, kde morfológická štruktúra endometria vykazuje dosť odlišnú skladbu. Hoci prevažná časť vyšetreného materiálu v tejto skupine ukazuje na výskyt proliferačnej fázy, predsa sú dosť časté i také zmeny, ktoré treba dosť opatrne posudzovať, čo pri dokonalej znalosti anamnézy a klinického vyšetrenia je pomerne jednoduché.

Možno to vidieť i z našich vyšetrení, že kým histologický nález u aktívnych folikulárnych cyst bol dosť vyrovnaný, zatiaľ histologický nález v skupine, kde takmer celý vaječník bol cystózne degenerovaný alebo išlo o cysty bez zjavných klinických príznakov, histologický nález na endometriu pripomínal príznaky chronickej endometritídy so zjavným množením pojivového tkaniva.

Za veľký prínos v tejto oblasti možno pokladať aj histochemickú analýzu, ktorá nás informuje o stave látkovej premeny priamo v endometriu. Táto je v našich výsledkoch zvlášť zreteľná pri hypofunkcii ovárií, kde histologický nález je síce rozdielny, ale histochemické výsledky sú dosť jednoznačné. Obdobné výsledky udáva aj K j u b a r (1964) pri histochemickom štúdiu endometria u kráv v puerpériu.

Pri posudzovaní preparátov sme sa v značnej miere zamerali na stav endometriálnych žliazok, ako ukazovateľov funkčnej schopnosti sliznice. Na základe počtu týchto žliazok, ako aj ich morfológickej štruktúry a sekréčnej schopnosti možno stanoviť diagnózu a spresniť hĺbku celej ovariálnej resp. neuro-endokrínnej poruchy. Podobný názor zdieľa aj W a c h s m u t h (1968).

Naše výsledky, podobne ako údaje M j u j u r s e p p a (1968), nás oprávňujú považovať histologické a histochemické štúdium endometria u kráv za dobrú metódu diagnostiky porúch plodnosti.

Technická spolupráca: S. Šestáková, F. Pješčáková a Š. Kaiferová.

Literatúra

- BOGDAN J., BOITOR I., BOGDAN I., Zu glandulär-zystischen Hyperplasie des Endometriums. Fortpfl. Haust. 6 : 325-330.
- BÖLCSHAZY K., 1960, Állatorvosi szülészet. Mezőgazdasági kiado, Budapest.
- BRODAUF H., 1957, Biopsia uteri beim Rind und Prognostik. Berl. 2. Kongr. dtsh. veterinärmed. Ges., Bad Nauheim, 6-7, 4 : 35-37.
- CSEH S., 1969, Kísérletek a tehének petefészek-működésének és méh-involúciójának serkentésének az ellés után. Magyar állatorvosok lapja 12 : 656-661.
- DEININGER G., 1956, Histologische Untersuchungen an der Gebärmutter Schleimhaut des Rindes im Hinblick auf die Biopsie. Vet. Diss. München.
- DIETER R., 1969, Zur Vorkommen und zur Bedeutung der Gelbkörpercyste beim Rind in neuer Sicht. Tierärztl. Umschau Konst. 5 : 216-223.
- GRUNERT E., 1955, Die Biopsie der Uterusschleimhaut der Stute in ihrer Technik und Methodik der Bewertung der histologischen Präparate. Arch. f. exp. Vet. med. 9 : 265-283.
- HOUDAS M., 1968, Contribution à l'étude des kystes du corps jaune chez la vache. Diss. Alfort.
- KJUBAR CH., 1964, O nekotorych mikroanatomsicheskikh, gistochimicheskikh i kletocnykh izmenenijach endometrija matki korovy. Eesti põllumaj. akad teadus. tööde kogumik 38 : 25-36.
- MARINOV U., LOVEL J. E., 1963, Cytology of the bovine uterine epithelium during the estrus cyste. Amer. J. Vet. Res., Chicago, 1 : 13-30.
- MJURSEPP J., 1968, Značeniye biopsii matki u korov pri bezplodii. Veterinarija, Moskva, 8 : 82-83.
- PETROV S. P., 1967 Fiziologija poslerodovogo perioda i sroki semenenija korov posle otela. Veterinarija, Moskva, 4 : 80-82.
- POPESCU P., MUSETESCU M., SEICIU FL., BOGDAN A., PARAIPAN V., 1968, Studiu clinic si histopatologic al endometritelor la Vaca. Lucr. Stiint. Ser. C Zootech. Med. Vet. 11 : 327-332.

- SCHNEIDER P., 1958, Beitrag zur Diagnostik der *Endometritis chronica* beim Rind mit Hilfe der Uterusbiopsie. Inaugural Dissertation, Bern.
- SCHULZ L., GRUNERT E., 1964, Kritische Betrachtungen unserer Kenntnisse über den uterinen und ovariellen Geschlechtszyklus des Rindes. Zbl. Vet. Med. 11 : 77-94.
- SCHVARC F., 1961, Praktické použitie biopsie endometria u kráv. Folia vet. 5, 1 : 201-207.
- SKJERVEN O., 1956, Untersuchungen zur Uterusbiopsie bei geschlechtlich normalen Rindern. Acta endocrinol. (Copenhagen) Suppl. 2, 26 : 5-101.
- SZÉKY A., DÓZSA L., 1956, Feststellung der Unfruchtbarkeitsursachen bei Kühen mit Hilfe des biopsischen Verfahrens. Acta veterinaria Scientiarum Hungaricae, Budapest, 6 : 259-286.
- ŠPAČEK J., 1963, Použitie biopsie uteru u kráv pri diagnostike endometritíd. Dipl. práca, Košice.
- VEŽNÍK Z., 1969, Biopsie endometrie. Vědecké práce výzkumného ústavu ČSAZV, Brno : 215 : 225.
- VEŽNÍK Z., 1957, Příspěvek k biopsii endometria u klisny. Vet. Med. (Praha) 2 : 17-42.
- VOLLMERHAUS B., 1957, Untersuchungen über die normalen zyklischen Veränderungen der Uterusschleimhaut des Rindes. Zbl. Vet. med. 4 : 18-50.
- WACHSMUTH U., 1968, Längenveränderungen der Uterindrüsen des Rindes auf Grund graphischer Rekonstruktionen. Zbl. f. Vet. med. 15 : 185-203.
- WAGNER W. C., HANSEL W., 1969, Reproductive physiology of the *post partum* cow. I. Clinical and histological findings. J. Reprod. Fert. Oxford 3 : 493-500.

Došlo dne 12. 7. 1971

ШВАРЦ Ф. (Ветеринарный институт, Кафедра акушерства, гинекологии и искусственного осеменения, Кошице, Чехословакия). Гистологические и гистохимические изменения в эндометрии коров при некоторых овариальных нарушениях. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 217-224, 1972.

Путем биопсии эндометрия и исследования после смерти производились гистологический и гистохимический анализы образцов эндометрия у коров при последующих нарушениях яичников: фолликулярные и желтые кисты, постоянные желтые тела, желтые тела комбинированные кистами и при гипофункции яичников. Из общего количества 125 изученных проб кистозные яичники с точки зрения морфологии эндометрия отличались весьма нерегулярной картиной. Часто наблюдались и признаки эндометрия без клинических изменений. У кист желтого тела морфологическая структура была почти однозначна, а именно развитая фаза секреции. У яичников, где желтые тела комбинированы кистами, диагноз был также атипичным. Он отличался особенно чередованием развитой фазы секреции с дегенеративными изменениями маточных желез. Последняя группа — гипофункциональные яичники, отличалась довольно выравненной микроскопической картиной, отличающейся в особенности изменениями на поверхностном эпителии и на маточных железах. Гистологические и гистохимические исследования образцов эндометрия при овариальных нарушениях, позволяют более точно произвести диагноз и лучше использовать гормональную терапию.

овариальные нарушения; гистология и гистохимия эндометрия; корова

SCHVARC F. (University School of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics, Gynaecology and Artificial Insemination, Košice, Czechoslovakia). *Histological and Histochemical Changes in the Endometrium of Cows in Some Ovarial Lesions*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 217-224, 1972.

The biopsy of endometrium and a post-mortem examination were performed in the samples of cow endometrium for histological and histochemical analysis in the following ovarian lesions: follicular and luteal cysts, *corpus luteum persistens*, yellow bodies combined with cysts and ovarian hypofunction. In the total number of 125 samples examined, the ovaria with cysts showed a very irregular picture from the point of view of endometrium morphology. Endometritis signs occurred quite fre-

quently without clinical changes. In the yellow body cysts the morphological structure was almost explicit showing a developed stage of secretion. In the ovaria where the yellow bodies were combined with cysts the finding was also of atypical nature. It was characterized mainly by the alternation of a developed secretion stage and degenerative changes of the uterine glandules. The last group — hypofunctional ovaria — showed quite balanced microscopical picture characterized particularly by changes in the superficial epithelium and in uterine glandules. The histological and histochemical examinations of the samples of endometrium in ovarian lesions make it possible to reach higher accuracy in the determination of the diagnosis and in the use of hormonal therapy.

ovarial disorders; histology and histometry of endometrium; cow

SCHVARC F. (Hochschule für Veterinärmedizin, Lehrstuhl für Obstetrik, Gynäkologie und künstliche Besamung, Košice, Tschechoslowakei). *Histologische und histochemische Änderungen im Kuhendometrium bei einigen Ovarialstörungen*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 217-224, 1972.

Durch Endometriumbiopsie und *post mortem*-Untersuchung wurden bei den folgenden Ovarialstörungen bei Kühen Endometriumpuben einer histologischen und histochemischen Analyse unterzogen: Follikel- und Luteinzysten, *Corpus luteum persistens*, mit Zysten kombinierte Gelbkörper und bei Hypofunktion der Ovarien. Von der Gesamtzahl der untersuchten Proben wiesen zystose Eierstöcke, was Endometriummorphologie anbelangt, ein sehr unregelmäßiges Bild auf. Endometritissymptome ohne klinische Änderungen kamen auch oft vor. Die morphologische Struktur der Gelbkörperzysten war fast eindeutig, und zwar eine erweiterte Sekretionsphase. Bei Eierstöcken, wo Gelbkörper mit Zysten kombiniert waren, war der Befund gleichweise untypisch. Er zeichnete sich vor allem durch Abwechseln der erweiterten Sekretionsphase mit degenerativen Änderungen der Uterusdrüsen aus. Die letzte Gruppe — die Hypofunktionsovarien, wies ein ziemlich ausgeglichenes mikroskopisches Bild auf, das sich vor allem durch Änderungen auf dem Oberflächenepithel und auf den Uterusdrüsen kennzeichnete. Histologische und histochemische Untersuchungen der Endometriumpuben bei Ovarialstörungen ermöglichen eine genauere Stellung der Diagnose und eine bessere Ausnutzung der hormonalen Therapie.

Ovarialstörungen; Endometriumphistologie- und Histochemie; Kuh

Adresa autora:

MVDr. F. Schvarc, CSc., Vysoká škola veterinárska, Košice

K. Prokůpek

Bioveta, Ivanovice na Hané

PROKŮPEK K. *Letální šok vyvolaný živou kulturou Bacillus cereus*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 225-232, 1972.

Mladá živá kultura *B. cereus* a některých dalších mikrobů podobných antraxu o koncentraci inokula 10^9 – 10^{10} , aplikovaná intraperitoneálně vnímavým zvířatům, je schopna vyvolat fenomen letálního šoku. Klinický a patomorfologický obraz takto vyvolaného šoku je velmi podobný klasickému endotoxinovému šoku. Použitím nepatogenních antraxových kmenů inokulovaných za zcela obdobných experimentálních podmínek se nepodařilo obdobný šok vyvolat.

Bacillus cereus; živá kultura; šoková aktivita

Aktivita vyvolávající šok patří svým způsobem k projevům patogenity mikrobů. Schopnost vyvolat šok se přičítá převážně gramnegativním mikrobům, především skupině střevních mikroorganismů. Avšak případy alimentárních infekcí, zjištěné u lidí a u zvířat, při kterých byli izolováni příslušníci rodu *Bacillus*, zejména *B. cereus*, nutí k úvaze, zda se touto schopností nevyznačují také některé grampozitivní mikroby (Nikodémusz a Csaba 1959, Emburger 1963, Elter 1966, Mesrobianu 1966).

Protože na tomto vědním úseku panuje dosud značná nejistota, pokusili jsme se vnést do této problematiky více světla. Naším hlavním úkolem bylo prověřit, zda aerobní sporulující mikroby, zejména skupina antraxu podobných, reprezentovaná *Bac. cereus*, se vyznačují účinností vyvolávající šok a zda tato aktivita je jejich přirozenou vlastností.

Otázka šokové aktivity aerobních sporulujících mikrobů není zcela nová. Její problematiku se už pokusili řešit Uemura (1914) a Patočka (1934), ale jen s částečným úspěchem. V pozdější době, zdá se, byla tato otázka pokládána za méně významnou a odsunuta do pozadí.

MATERIÁL A METODY

Materiál. V pokusech jsme použili 25 dobře definovaných kmenů *B. cereus*. Většina kmenů pocházela z naší sbírky a byla získána převážně z materiálů živočišného původu. Ze skupiny bacilů podobných antraxu jsme zařadili do pokusů ještě po několika kmenech *B. cereus* var. *cylindrosporus*, *B. cereus* var. *mycoides* a *B. megaterium*. Z ostatních příslušníků rodu *Bacillus* jsme

použili 18 kmenů *B. subtilis* a dále orientačně po dvou kmenech *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. circulans*, *B. brevis* a *B. sphaericus*.

Pro srovnání jsme udělali řadu pokusů se skupinou 12 nepatogenních antraxových kmenů. Mimoto bylo do srovnávacích pokusů zařazeno také několik kmenů gramnegativních tyčinek. Byly to dva kmeny *E. coli*. Podle předané reference (Dr. Salajka) pocházely kmeny z WHO — International Escherichia Centre States Seruminstitut (Ørskov) v Copenhagenu. Hemolytický kmen 5368, sérotyp 0 141 : K 85 (B) : H 4, byl izolován z prasete. Nehemolytický a nepohyblivý kmen 5356, sérotyp 0 111 : K 58 (B), byl izolován ze střeva dítěte při dyspepsii.

Vedle kmenů *E. coli* jsme použili ještě několika kmenů salmonelových (*S. typhimurium*, *S. cholerae suis*, *S. bareilly* a *S. pullorum*). Tyto kmeny byly izolovány a otypovány naším ústavem a prověřeny příslušným referenčním centrem.

U žádného z použitých kmenů nebyla před pokusem zvyšována virulence pasážováním.

Kultura a médium. Použili jsme standardně bakteriální suspenzi pětihodinové kultury narostlé na 20% krevním agaru při 37 °C a spláchnuté sterilním fyziologickým roztokem.

Zvířata. Vhodnými pokusnými zvířaty byla morčata (350–450 g) a syříšští křečci (120–150 g). Některé pokusy byly konány na bílých myších (20–26 g) a bílých krysách (150–180 g) konvenčně chovaných, na mladých kočkách (1400–1800 g) a na králících (2–3 kg).

Inokulum. Kulturu, pokud není uvedeno jinak, jsme aplikovali intraperitoneálně. Počet bacilárních buněk v inokulu, zjišťovaný plotnovou metodou zředovací technikou, byl stanoven pro morčata na 10^{10} , pro křečky 10^8 – 10^9 , bílé myši $5 \cdot 10^8$, bílé krysy a kočky 10^{10} a pro králíky 10^9 – 10^{10} .

Aktivita vyvolávající šok. Šokový účinek jsme hodnotili především testem letálního šoku na citlivých zvířatech (morčata, křečci). Za typický letální šok jsme považovali exitus šokem s charakteristickým klinickým průběhem do 12 hodin po inokulaci. Vedle tohoto hlavního kritéria jsme někdy také používali testu myši letality. Inokulum jsme aplikovali intraperitoneálně. Výsledek byl posuzován za 24 hodin po inokulaci.

VÝSLEDKY

Aktivita živé kultury uvedených kmenů byla posuzována především z toho hlediska, zda je schopna vyvolat u vnímavých zvířat letální šok s typickým klinickým obrazem a s patomorfologickým nálezem.

V předpokusech jsme si orientačně ověřili, v jakém vztahu je tato aktivita ke stáří populace a koncentraci inokula. Tento vztah u jednoho kmene (C 19) a variační šíře hodnot u všech 25 cereových kmenů jsou vyjádřeny v tab. I. Na výsledcích zde uvedených můžeme sledovat, že při téže koncentraci inokula je aktivnější mladá kultura. Z těchto údajů jsme vycházeli v dalších pokusech.

Všemi 25 cereovými kmeny se podařilo vyvolat typický šok, převážně s letálním průběhem za čtyři až šest hodin po inokulaci. Třebaže, jak jsme se mohli přesvědčit, je cereová populace na krevním agaru i po dvoudenní až tří denní inkubaci vysporulována jen spoře, může být ubývání aktivity vyvolávající šok s přibývajícím stářím kultury alespoň částečně ve vztahu k narůstající sporulaci.

K orientačním pokusům o účinku sporové suspenze, vyvolávající šok, jsme použili 14 dobře vysporulovaných cereových kmenů. Stupeň sporulace

<i>B. cereus</i>	Stáří kultury hod.	Intraperitoneální inokulace — celkový počet bacilárních buněk			
		10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰
		exitus šokem za hodin			
Kmen C 19	5	0	10	3–4	2–3
	16	0	RŠ	4–6	3–5
	24	0	RŠ	8–10	4–8
	48	0	RŠ	RŠ	8–10
	72	0	RŠ	RŠ	32
Variální šíře hodnot šokové aktivity 25 cereových kmenů	5	0	8–12	3–5	2–4
	16	0	RŠ–18	6–9	4–6
	24	0	RŠ	8–12	5–8
	48	0	RŠ	RŠ–20	10–14
	72	0	RŠ	RŠ	RŠ–32

Symbole: O — bez klinických příznaků
RŠ — reverzibilní šok

byl kontrolován podle Ivanova a Dačeviče (1964) a procento klíčení počtem živých spór, stanoveným zředovací kultivační metodou.

U morčat docházelo k exitu dávkou 10¹⁰ při i. p. inokulaci většinou za 6 až 10 hodin. Roztěry z dutiny břišní, obarvené Raebigerem, prokázaly vedle četných tyčinek také ještě výrazný podíl spór.

Z těchto orientačních pokusů je možné usuzovat, že cereová kultura aplikovaná ve formě suspenze spor vnímavým zvířatům v přiměřených dávkách může rovněž vyvolat šokový jev, ale zdá se, že s poněkud protražovanějším účinkem než mladá populace vegetativních buněk. Tento protražovanější účinek by mohl být vysvětlen skutečností, že část spór *in vivo* nevyklíčila. Proto jsme u převážné části našich pokusů na laboratorních zvířatech použili mladé (5 hod.) kultury.

Podobně jsme vyvolali letální šok živou kulturou dalších mikrobů podobných antraxu, jako je *B. cereus* v. *cylindrosporus*, *B. cereus* v. *mycoides*, a také některými kmeny *B. megaterium*.

Z ostatních bacilů z 18 kmenů *B. subtilis* způsobilo 7 mírný, protražovaný reverzibilní průběh šoku. Orientačními pokusy s kmeny *B. brevis*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. pumilus*, *B. sphaericus* a *B. coagulans* se nepodařilo fenomén šoku vyvolat. Tím však nelze vyloučit, že některé kmeny těchto bacilárních druhů se touto schopností nevyznačují.

Soubor klinických příznaků se projevoval zpočátku mírným neklidem, později ochablostí, lehkými parézami končetin, později prostrací a při ireverzibilním průběhu šoku exitem v algidním stadiu. Zřetelně klinické příznaky se dostavovaly někdy už za 15 minut, většinou však za 30 až 60 minut po inokulaci.

Letální šok provázal charakteristický patomorfologický nále z, který byl výrazný zejména při intraperitoneální inokulaci na morčeti a křečku (peritoneální syndrom). Pravidelně jsme zjišťovali difúzní sérózní peritonitidu (zmnožení tekutiny v dutině břišní, která byla směsí inokula, exsudátu a transudátu). Podle klinického průběhu měla tekutina sanguinolentní až červenohnědé zabarvení od příměsí krve. Na játrech jsme zjišťovali kongesci, někdy tukovou dystrofii, ne však nekrózu, na ledvinách hyperemii bez nekrózy, na plicích hyperemii a edém. Na intestinu jsme nalézali kongesci některých úseků tenkých střev, spojenou někdy s trombotizací kapilár a s následnou nekrózou sliznice. Řídčeji se objevovaly tečkovité až plošné krevní výrony na sliznici a meléna.

U králíků se dostavil šok s fatálním průběhem při dávce 10^{10} živé kultury *B. cereus* obvykle za čtyři až šest hodin po inokulaci.

Velmi vnímavým zvířetem byl také syrský křeček. Dávka, která obvykle stačila k vyvolání letálního šoku, byla 10^8 živých bacilárních buněk. K exitu docházelo za tři až pět hodin po aplikaci. Klinický průběh a sekční nále z byl obvyklý, stejný jako u morčat.

V některých našich pokusech jsme použili bílých myší. Dávka $5 \cdot 10^8$ zpravidla postačila k vyvolání letálního šoku za tři až šest hodin po inokulaci.

Orientačně jsme použili k vyvolání letálního šoku také bílých krys a mladých koček. V pokusu s krysami bylo 10 dospělých zvířat očkováno příslušnou dávkou živé kultury cereového kmene C 314. Za půl hodiny až za hodinu po inokulaci se objevila malátnost. Z očkovaných krys zašlo v době od dvou do pěti hodin sedm zvířat. U ostatních krys se dostavila krátkodobá malátnost, po jejímž odeznění zůstaly krysy čilé (mírný reverzibilní šok).

Skupina mladých koček byla očkována uvedenou dávkou živé kultury cereového kmene C 19. Onemocnění se dostavilo záhy a vedle obvyklých příznaků se objevilo také zvracení. Všechny očkované kočky zašly za tři až čtyři hodiny za typického nálezu v dutině peritoneální.

Při srovnání účinku R fáze s S fází živé kultury kmene *B. cereus* C 19 při intraperitoneální aplikaci na morčatech jsme mohli pozorovat, že R fáze se ve své schopnosti vyvolávat letální šok výrazně nelišila od S fáze.

Podkožní aplikací živé kultury kmene *B. cereus* C 19 v dávce 10^{10} se klinické příznaky šoku v pokusech na morčatech vyvolat nepodařilo.

Letální šok jsme mohli také vyvolat intravenózní aplikací živé kultury cereového kmene C 19 dospělým králíkům s exitem za tři až pět hodin.

Udělal i jsme jednorázový pokus na větší skupině zvířat (50 morčat), která byla současně naočkována živou kulturou cereového kmene C 19 obvyklým způsobem. U všech očkovaných zvířat se dostavily klinické příznaky šoku za 30 až 60 minut po inokulaci. Zvířata zašla letálním šokem za dvě až tři hodiny.

Vzdor tomu, že výsledek byl tak jednoznačný, je třeba počítat s tolerantními jedinci, kteří letálním šokem neonemocní, nebo u nichž se ani nedostaví klinické příznaky reverzibilního šoku, jak jsme to při některých pokusech pozorovali.

Tab. II podává přehledně výsledky pokusů se živou kulturou *B. cereus* a s některými dalšími příslušníky mikrobů podobných antraxu. Tabulka dokresluje údaje uvedené v textu.

Jestliže jsme pokusy na vnímavých zvířatech mohli prokázat schopnost živé kultury cereových kmenů vyvolat stav letálního šoku, pak nás pochopitelně zajímala otázka, zda se podobnou aktivitou vyznačují také kmeny antraxové, zejména ty, které jsou svou virulencí blízké kmenům antrakoidním.

Počet kmenů	Počet očko- vaných morčat	Počet morčat klinicky nemoc- ných	Procento morčat klinicky nemocných	Počet morčat	
				s reverzibil- ním šokem	exitus šokem za hodin
<i>B. cereus</i> 25	50	43	86	1	46 (2–4)
<i>B. cereus</i> <i>v. mycoides</i> 3	6	5	83	0	5 (3–5)
<i>B. cereus v.</i> <i>cylindrosporus</i> 10	10	10	100	0	10 (3–5)
<i>B. megaterium</i> 12	24	13	54	1	12 (3–12)

Pokusili jsme se proto o experimentální průkaz schopnosti vyvolat fenomén šoku nepatogenními antraxovými kmeny za zcela obdobných experimentálních podmínek. Živou kulturou těchto kmenů se nepodařilo na vnímavém zvířeti při intraperitoneální aplikaci pěti hodinové kultury v dávce 10^{10} vyvolat letální šok

Toliko u jednoho akapsulárního, pro bílé myši avirulentního kmene, izolovaného z chromočiněných indických kozin, jsme mohli sledovat odlišný průběh pokusu. U všech pěti očkovaných morčat se dostavila do jedné až čtyř hodin po inokulaci malátnost, která byla u tří zvířat krátkodobě přechodná, ale u dvou zvířat setrvala dále s exitem třetí den. V dutině peritoneální jsme našli 2 až 3 ml krvavě zbarvené tekutiny. I když nešlo o typický letální šok, přece jen by bylo možné podle klinického průběhu a sekčního nálezu (příznak peritoneálního syndromu) pokládat tento jev za šokovou reakci, projevující se protrahovaným účinkem. Výjimečně zaznamenali fenomén letálního šoku u nepatogenního antraxového kmene P a t o č k a (1934) a P r o k ů p e k (1952).

Hodnotíme-li výsledky pokusů na tomto úseku, můžeme v podstatě konstatovat, že nepatogenní antraxové kmeny se obvykle nevyznačují šokovou aktivitou. Tato skutečnost patří zřejmě mezi důležité diferenciatní znaky, kterými se rozlišují *B. anthracis* od skupiny mikrobů antraxu podobných.

Dalším naším záměrem bylo porovnat, třeba jen v hrubých rysech, letální šok vyvolávaný cereovými kmeny s účinkem několika náhodně vybraných zástupců enterobakterií. K srovnávacím pokusům jsme zvolili tyto kmeny: hemolytický *E. coli* 5368, nehemolytický *E. coli* 5356 a dalších šest čerstvě izolovaných kmenů *E. coli*. Dále jsme do pokusů zařadili některé často se vyskytující sérotypy salmonel (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. cholerae suis*, *S. bareilly* a *S. pullorum*), vesměs čerstvě izolované.

Pokusy jsme dělali na morčatech shodným způsobem a za týchž podmínek, jako byly konány pokusy s kmeny cereovými (jen kultura *S. pullorum* byla 16hodinová).

Při aplikaci kmenů *E. coli* (5368 a 5356) docházelo k exitu šokem za čtyři až šest hodin po inokulaci. Účinek dalších šesti kmenů *E. coli* byl různý. Tři z nich vyvolaly poněkud protrahovaný letální šok, zatímco další dva kmeny jen hnisavý proces v dutině břišní s následným exitem za 24 až 36 hodin (čistá kultura *E. coli*). Aplikace jednoho kmene *E. coli* zůstala bez klinické odezvy.

U salmonelových kmenů se šokový účinek projevil různorodě. Při použití *S. enteritidis* a *S. typhimurium* docházelo k exitu morčat letálním šokem v dosti širokém časovém rozsahu od 3 do 15 hodin po aplikaci. Také *S. bareilly* vyvolávala letální šok v širším časovém rozsahu (6 až 18 hod.), někdy však jen šok reverzibilní. Kmeny *S. cholerae suis* a *S. pullorum* měly nejslabší účinek. K šoku s fatálním průběhem docházelo někdy za 10 hodin, jindy až za několik dnů. Často byl šok reverzibilní a v některých případech se neobjevila ani klinická odpověď.

Z výsledků uvedených pokusů můžeme vyvodit, že letálnímu účinku *B. cereus* se nejvíce blížily patogenní kmeny *E. coli* (5368 a 5356), zejména hemolytický kmen 5368, který, možno říci, měl shodnou aktivitu jako *B. cereus* C 19. Účinek salmonelových kmenů byl nevyrovnaný a ve srovnání s kmeny cereovými *E. coli* 5368 a 5356 celkově slabší.

DISKUSE

Až do současné doby panovala nejistota, zda se aerobní sporulující mikroby vyznačují šokovou aktivitou. Na tuto problematiku upozornil už Uemura (1914) a zejména Patočka (1934), který hledal vysvětlení pro schopnost vyvolávat hemolytický peritoneální syndrom svého delší dobu pasážovaného antrakoidního kmene ve spolupůsobení střevní mikroflóry, hlavně *E. coli*. Důvody, které ho vedly k těmto závěrům, vycházely hlavně z faktu, že použitý kmen se původně touto vlastností nevyznačoval a získal ji teprve po jednorocní pasáži na myších.

Z výsledků našich pokusů je zřejmé, že se podařilo relativně velkým počtem kmenů *B. cereus* (25), které nebyly speciálně k pokusům připravovány pasážováním, a také jinými mikroby podobnými antraxu vyvolat živou kulturou při parenterální aplikaci, zejména intraperitoneální, u vnímavých zvířat (morčata, syřští křečci aj.) fenomén letálního šoku, provázený peritoneálním syndromem. Tento šok se svým klinickým průběhem a patomorfologickým obrazem velmi podobal klasickému endotoxinovému šoku. Šok vyvolaný cereovou kulturou byl zcela obdobný, jaký se nám dařilo vyvolat ve srovnávacích pokusech za týchž experimentálních podmínek hemolytickým kmenem *E. coli* 5368.

Zdá se, že nedostatek v Patočkových pokusech vycházel z toho, že bylo experimentováno toliko s jedním kmenem, který skutečně mohl postrádat schopnost vyvolávat letální šok, anebo bylo náhodně použito tolerantních pokusných zvířat. Také nám se stal případ, že čtyři cereové kmeny při intraperitoneální aplikaci morčatům zůstaly bez klinické odezvy, ačkoliv v později opakovaných pokusech, uskutečněných za zcela obdobných podmínek, byl u nich výrazný letální šokový účinek prokázán.

Tyto experimentálně získané výsledky se shodují celkem dobře s údaji o výsledku vyšetření některých alimentárních infekcí, kde z aerobních sporulátů bývá nejčastěji zjišťován *B. cereus*.

Podle výsledků uvedených v tab. II se vyznačovaly celkem shodnou letální aktivitou také kmeny *B. cereus v. cylindrosporus* a *B. cereus v. mycoides*. Doba, za kterou došlo k exitu zvířat po inokulaci živé kultury, byla relativně krátká a vzájemně si velmi blízká. U *B. megaterium*, který patří také ke skupině mikrobů antraxu podobných, projevila se tato schopnost jen asi u poloviny testovaných kmenů, přičemž doba, za kterou došlo k exitu šokem, byla někdy pod-

statně delší. Z poměrně velkého počtu 18 kmenů *B. subtilis* se jen u sedmi kmenů objevila mírná šoková aktivita, která vedla k exitu při značně protražovaném průběhu.

Podarilo se nám tedy prokázat, že živá bacilární buňka *B. cereus* a některých dalších mikrobů podobných antraxu je nositelkou šokové aktivity, která se projevuje za určitých podmínek fatálním průběhem.

Naproti tomu antraxové kmeny na různém stupni virulence se touto schopností zpravidla nevyznačují. Výsledek našeho pokusu s akapsulárním kmenem a v pokuse na bílých myších s nepatogenním antraxovým kmenem, při němž ze skupiny pěti pokusných morčat zašla dvě třetí den po inokulaci za příznaků značně protražovaného šoku, nemůžeme považovat za typický projev letální šokové aktivity. Domníváme se však, že se vyskytují nepatogenní antraxové kmeny, které se touto vlastností mohou vyznačovat, jak tomu nasvědčují uvedené případy (Patočka 1934, Prokůpek 1952), kdy u dvou nepatogenních antraxových kmenů byla schopnost vyvolat typický letální šok prokázána. To jsou ovšem jen vzácné výjimky. Je proto možné pokládat schopnost vyvolávat letální šok za charakteristickou vlastnost bacilů podobných antraxu, a tím i za důležitý diferenciativní znak mezi *B. anthracis* a *B. cereus*.

Technická spolupráce: Jan Kubeš.

Literatura

- ELTER B., 1966, Beitrag zum Problem der Lebensmittelvergiftungen durch aerobe Sporenbildner. Z. Ges. Hyg. 12 : 65-69.
- EMBERGER O., 1963, Studium hygienického významu aerobních sporulujících mikrobů. Čs. Hyg. 8 : 137-146.
- IVANOV M. M., DAČEVIC L. J., 1964, Opređenje živých i mrtvých spor sibirskoj jazvy. Trudy GNKI vet. preparatov 12 : 171-173.
- MESROBEANU L., MESROBEANU J., 1966, Toxinelle germenilor gram-positivi. Microbiol. (Bucuresti) 11 : 193-208.
- NIKODEMUSZ J., CSABA K., 1959, Die Bedeutung der aeroben Sporenbildner bei Lebensmittelvergiftungen. Z. Hyg. Infkrh. 146 : 156-160.
- PATOČKA F., 1934, Experimentální studie o patogenních možnostech mikrobů podobných bacilu anthracis. Monografie, Praha.
- PROKÚPEK K., 1952, Vliv vyhnívání koželužských kalů na životnost a virulenci zárodků sněti slezinné. Spisy vys. školy vet., Brno, 20 : 1-30.
- UEMURA H., 1914, Untersuchungen über Milzbrandähnliche Bacillen. ZBL. Bakt. Orig. I. Abt., 75 : 21-35.

Došlo dne 12. 11. 1971

ПРОКУПЕК К. (Биовета, Ивановице-на-Гане, Чехословакия). Летальный шок, вызванный живой культурой *Bacillus cereus*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 225-232, 1972.

Молодая живая культура *B. cereus* и некоторых других, подобных антраксу микробов концентрацией инокуля 10^9 — 10^{10} , вводимая интраперитонеальным способом восприимчивым животным, способна вызвать феномен летального шока. Клиническая и патоморфологическая картина вызванного таким образом шока весьма подобна классическому эндотоксическому шоку. Подобный шок не удалось, однако, вызвать при помощи непатогенных антраксовых штаммов, инокулированных в совершенно таких же экспериментальных условиях.

Bacillus cereus; живая культура; активность шока

PROKÚPEK K. (Bioveta, Ivanovice na Hané, Czechoslovakia). *The Lethal Shock Caused by a Live Culture of Bacillus cereus*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 225-232, 1972.

A young live culture of *B. cereus* and some other microbes similar to anthrax, inoculum concentration 10^9 — 10^{10} , applied intraperitoneally to susceptible animals, is capable of evoking a phenomenon of lethal shock. The clinical and patho-morphological aspects of the shock generated in this way are similar to those in the normal endotoxin shock. The application of non-pathogenic anthrax strains, inoculated under the same experimental conditions, did not provoke such a shock.

Bacillus cereus; live culture; shock activity

PROKÚPEK K. (Bioveta, Ivanovice na Hané, Tschechoslowakei). *Letaler Schock ausgelöst von einer lebendigen Kultur des Bacillus cereus*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 225-232, 1972.

Eine junge lebendige Kultur von *B. cereus* und einiger anderen anthraxähnlichen Mikroben von einer Inokulumkonzentration von 10^9 — 10^{10} , die intraperitoneal anfälligen Tieren appliziert wird, kann ein Phänomen eines letalen Schocks auslösen. Das klinische und pathomorphologische Bild des auf diese Weise ausgelösten Schocks ist dem klassischen Endotoxinschock sehr ähnlich. Es ist nicht gelungen einen ähnlichen Schock durch Benützung von nichtpathogenen Anthraxstämmen, die unter vollkommen analogen Experimentalbedingungen appliziert wurden, auszulösen.

Bacillus cereus; lebendige Kultur; Schockaktivität

Adresa autora:

MVDr. K. Prokúpek, CSc., Bioveta, Ivanovice na Hané

PROTILÁTKOVÁ ODPOVĚĎ ZVÍŘAT NA APLIKACI VAKCÍN PROTI VZTEKLINĚ

Z. Čupera

Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno, odbor biopreparátů, Ivanovice na Hané

ČUPERA Z. *Protilátková odpověď zvířat na aplikaci vakcín proti vzteklině.* Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 233-242, 1972.

Sledovali jsme hladinu virus-neutralizačních protilátek v sérech zvířat po aplikaci avianizované a mozkomíšní vakcíny proti vzteklině. Bylo použito operačních čísel komerčně vyráběných vakcín, které byly aplikovány v běžných vakcinačních dávkách, jednak *i. m.* způsobem, jednak *s. c.* způsobem. Vyhodnocovali jsme pomocí virusneutralizačního testu na myších stanovením 50% chráněnosti ředění séra (PD₅₀) proti konstantní dávce fixního viru vztekliny kmene CVS. Aplikace obou vakcín vyvolala u zvířat tvorbu virus-neutralizačních protilátek v dostatečné výši, zaručující solidní imunitu vakcinovaných zvířat. U psů nebyl zjištěn rozdíl v tvorbě virus-neutralizačních protilátek při *i. m.* nebo *s. c.* aplikaci vakcíny. U koček a koz byla hladina protilátek po *i. m.* aplikaci vyšší než po aplikaci *s. c.* Aplikace mozkomíšní vakcíny vyvolala u koz vyšší tvorbu protilátek než aplikace vakcíny avianizované. Naopak u králíků byl titr protilátek vyšší po avianizované vakcíně než po vakcíně mozkomíšní. Zjištěné hodnoty PD₅₀ po aplikaci protivzteklinových vakcín jsou vysoké a odpovídají literárním údajům jiných autorů: avianizovaná vakcína: psi 1 : 52—1 : 95, skot. 1 : 106—1 : 109, kozy 1 : 367—1 : 385, prasata 1 : 36, králíci 1 : 625, morčata 1 : 625; mozkomíšní vakcína: kočky 1 : 78, kozy 1 : 338—1 : 625, prasata 1 : 166, ovce 1 : 468, králíci 1 : 265—1 : 625, morčata 1 : 625.

virus-neutralizační protilátky; avianizovaná vakcína; mozkomíšní vakcína; aplikace *i. m.* a *s. c.*; virusneutralizační test na myších

V posledních letech dochází jak u domácích zvířat, tak u zvířat divoce žijících ke značnému rozšíření výskytu onemocnění vzteklinou. Jedním z účinných prostředků v boji s touto nákazou je soustavná a cílevědomá vakcinace všech zvířat, která přicházejí do styku s největšími rozšiřovateli této nákazy — s liškami. Aby však bylo tímto způsobem dosaženo příznivých výsledků, je třeba mít k dispozici dostatek kvalitní vakcíny. Kvalita vakcíny a její účinnost se ověřuje převážně zkouškami na laboratorních zvířatech. Pro jednotlivé druhy vakcín doporučuje Světová zdravotnická organizace (W. H. O.) standardní zkoušky účinnosti. Pro inaktivované vakcíny se doporučuje zkouška účinnosti na myších podle H a b e l a, pro živé avianizované vakcíny zkouška účinnosti na morčatech (K o p r o w s k i) nebo na myších (N y l a r test). Na našem pracovišti se pro oba druhy vakcín používá modifikace metody podle N a z a r o v a (Č u p e r a 1969). Vhodná je také metoda podle S e l i m o v a. Účinnost vakcíny lze rovněž stanovit na základě obsahu viru ve vakcíně (O t t a C a r l s o n 1960; B o u r d i n a S u r e a u 1965).

Účinnost protivzteklinových vakcín lze však stanovit také přímo na vakcinovaných zvířatech na základě stanovení protilátkové odpovědi vakcinovaných zvířat pomocí virusneutralizačního testu (VNT). Určitá hladina virusneutralizačních protilátek (VNP) zaručuje imunitu očkovaných zvířat. Její výše však není přímo úměrná ochranné schopnosti vakcíny. Nelze tedy stanovit, že čím vyšší je hladina protilátek v krvi, tím vyšší je imunogenní potence vakcíny (Merry a kol. 1969). Cabasso a kol. (1965) zjistili pomocí VNT 50% chráněnost séra — PD_{50} — po vakcinaci psů tkáňovou vakcínou proti 50 LD_{50} CVS viru v ředění v průměru 1 : 45. Vrchol protilátek zjistili za dva až čtyři týdny po vakcinaci; po čtyřech týdnech nastal pokles VNP a 12 týdnů po vakcinaci byla PD_{50} již jen v ředění séra 1 : 10. Kesíč a Zdravko (1967), zjistili nejvyšší titr VNP v sérech vakcinovaných psů za 28 dnů po vakcinaci. Za 6 měsíců po vakcinaci byly v sérech vyšetřovaných psů zjištěny VNP, přičemž jejich hladina byla u živých vakcín typu Flury vyšší než u inaktivované vakcíny. Následnou čelenž fixním virem přežilo všech 100 % vakcinovaných psů. Lawson a kol. (1967) zjistili u skotu vakcinovaného vakcínou z ERA kmene ještě čtyři roky po vakcinaci titr protilátek 1 : 15—1 : 25, stejně jako u psů za tři roky a u koček za 28 měsíců po vakcinaci. Vakcinovaná zvířata čelenž přežila, zatímco kontrolní nevakcinovaná zvířata uhynula. Fuenzalida (1967) stanovoval titr protilátek u lidí a zjistil, že po třech vakcinačních dávkách za použití vakcíny připravené z mozků sajících myšek byl titr v průměru 1 : 180, po pěti vakcinačních dávkách 1 : 200.

MATERIÁL A METODY

Sledovali jsme protilátkovou odpověď různých domácích a laboratorních zvířat po vakcinaci mozkomíšní a avianizované vakcíny. Výši VNP jsme zjišťovali pomocí VNT na myších.

POKUSNÁ ZVÍŘATA

Tvorbu a výši VNP jsme zjišťovali v krvi vakcinovaných psů, koček, skotu, koz, ovce, prasat, králíků a morčat. Používalo bylo zvířat bez rozdílu pohlaví či stáří.

POUŽITÉ VAKCÍNY

V pokusech bylo používáno vakcín komerčně vyráběných Biovetou Ivanovice na Hané, a to:

- a) Avianizovaná vakcína proti vzteklině — živá vakcína, připravovaná jako 33% lyofilizovaná suspenze zhomogenizovaných kuřecích embryí, ve kterých se pomnožil modifikovaný avianizovaný vzteklinový virus Flury LEP (HEP).
- b) Vakcína proti vzteklině — připravovaná jako 20% mozkomíšní suspenze ovčí, infikovaných fixním virem vztekliny (kmen GNKI); je konzervovaná fenolem a lyofilizovaná.

APLIKACE VAKCÍN

Vakcína byla aplikována jednak podkožně (*s. c.*) za lopatkou (u prasat za uchem), jednak nitrosvalově (*i. m.*) do svaloviny stehna.

ODBĚR KRVE

Krev jsme odebírali v různých časových intervalech, většinou za 10, 21 a 28 dnů, buď z *vena jugularis* (skot, ovce, kozy), z *vena saphena* (psi), kardiální punkcí (králíci), z konečku ocasu (prasata) nebo totálním vykrvením (kočky, morčata).

SKLADOVÁNÍ SÉRA

Získané sérum bylo skladováno v mrazícím pultě při teplotě -30°C .

VIRUSNEUTRALIZAČNÍ TEST

Způsob provedení VNT byl v principu shodný s metodou popsanou Atanasie (1967) a citovanou Staroštikem a Čuperou (1970). VNT byl prováděn na skupinách bílých myší o váze 15 až 18 g při sériovém ředění séra za přítomnosti konstantního množství CVS viru (40 LD_{50}). LD_{50} CVS viru bylo stanoveno v předběžné titraci na myších rovněž o váze 15 až 18 g. PD_{50} vyšetřovaného séra bylo stanoveno podle vzorce:

$$\frac{50 - \% \text{ hynutí nižší než } 50 \%}{\% \text{ hynutí vyšší než } 50 \% - \% \text{ hynutí nižší než } 50 \%}$$

Dosažený výsledek se násobí logaritmem faktoru ředění a připočte se k logaritmu ředění, při němž uhynulo méně než 50 % myší. Tím se zjistí ředění séra, při kterém 50 % pokusných myší uhynie a 50 % myší přežívá. Při každém VNT jsme současně dělali kontrolní titraci použitého CVS viru, abychom zjistili, kolik LD_{50} bylo skutečně ve vlastním pokuse použito.

VÝSLEDKY

PSI

Tři skupiny psů byly vakcinovány avianizovanou vakcínou proti vzteklině. Bylo použito tři operačních čísel komerčně vyrobené vakcíny. Vakcinační dávka (3 ml) byla aplikována v každé skupině polovině zvířat *i. m.* do svaloviny stehna, druhé polovině *s. c.* za lopatkou. Krev k VNT se odebírala před vakcinací, 8, 15, 21, 30 a 90 dnů po vakcinaci. Hladina VNP byla zjišťována:

a) orientačním vyšetřením (screening test) jednotlivých krevních sér vakcinovaných psů;

b) kvantitativním vyšetřením směsných vzorků krevních sér jednotlivých skupin psů;

c) kvantitativním vyšetřením jednotlivých krevních sér vakcinovaných psů.

Výsledky: Orientačním vyšetřením jsme zjistili, že séra psů před vakcinací neobsahovala VNP s výjimkou tří psů (č. 645, 584 a 669). V sérech psů z odběru 15 a 21 dnů po vakcinaci byly ve všech případech zjištěny VNP.

Kvantitativním vyšetřením směsných vzorků jsme VNP nezjistili v sérech z odběru před vakcinací a z odběru osm dnů po vakcinaci. Za 15 dnů po vakcinaci jsme zjistili PD_{50} v ředění séra 1 : 25, za 21 den po vakcinaci v ředění séra 1 : 41.

I. Stanovení PD₅₀ v sérech psů po vakcinaci avianizovanou vakcínou proti vzteklině

Applikace	Op. č. vakc.	Pes čís.	Orientační vyšetření	Kvantitativní vyšetření							
				směsných vzorků z odběru				jednotlivých vzorků z odběru			
				před vakci- nací	po vakcinaci			před vakci- nací	po vakcinaci		
					8 dní	15 dní	21 den		21 den	30 dní	90 dní
<i>i. m.</i>	VL	645	+	0	1 : 5	1 : 25	1 : 41	1 : 9	1 : 37	1 : 114	
		646	—					0	1 : 25	1 : 125	
		647	—					1 : 7	1 : 209	1 : 125	
		649	—					0	1 : 25	1 : 125	
	02	5	—					0		1 : 38	
		6	—					0		1 : 53	1 : 81
	204	584	+					1 : 25	1 : 56		
		591	—					0	1 : 19		
		592	—					0	1 : 56		
	Průměrná hodnota po <i>i. m.</i> aplikaci							1 : 4	1 : 61	1 : 96	1 : 81
<i>s. c.</i>	VL	666	—	0	1 : 5	1 : 25	1 : 41	1 : 5	1 : 125	1 : 76	
		669	+					1 : 10	1 : 5	1 : 125	
		670	—					0	1 : 5	1 : 125	
		671	—					1 : 7	1 : 25	1 : 57	
	02	7	—					0		1 : 125	1 : 125
		8	—					0		1 : 71	1 : 30
		9	—					1 : 6		1 : 90	1 : 125
		10	—					0		1 : 82	1 : 56
	204	526	—					1 : 5	1 : 58		
		527	—					1 : 2	1 : 44		
	Průměrná hodnota po <i>s. c.</i> aplikaci							1 : 4	1 : 43	1 : 94	1 : 84
	Průměrná hodnota PD ₅₀				1 : 5	1 : 25	1 : 41	1 : 4	1 : 52	1 : 95	1 : 82

Na základě těchto příznivých výsledků jsme provedli kvantitativní vyšetření jednotlivých sér — výsledky jsou uvedeny v tab. I. Z celkového počtu 19 vyšetřovaných psů z odběru před vakcinací nebyly zjištěny VNP u 10 psů, v zanedbatelné výši (PD₅₀ 1 : 2—1 : 10) u 8 psů a jen u jednoho psa (č. 584) byl zjištěn titr 1 : 25. Za 21 den po vakcinaci byla zjištěna průměrná hodnota 50% chráněnosti séra — PD₅₀ — v ředění 1 : 52, za 30 dnů 1 : 95. Za 90 dnů po vakcinaci bylo zjištěno PD₅₀ v ředění 1 : 82. Ve VNT bylo podle kontrolní titrace CVS viru použito 34 LD₅₀. Nástup tvorby VNP byl zjištěn tedy 15 dnů po vakcinaci, nejvyšší titr za 30 dnů po vakcinaci. V pokusech nebyl zjištěn rozdíl v tvorbě VNP při *i. m.* nebo *s. c.* aplikaci vakcíny.

KOČKY

Dvě skupiny koček po třech zvířatech byly vakcinovány mozkomíšní vakcínou proti vzteklině. Dávka vakcíny 2 ml byla aplikována první skupině zvířat s. c., druhé skupině *i. m.* Za 21 den po vakcinaci byla zvířata vykrvena, včetně nevakcinované kontroly. V séru nevakcinované kontroly nebyly zjištěny VNP. U koček vakcinovaných byla zjištěna PD₅₀ 21 den po vakcinaci v ředění séra 1 : 15–1 : 125 (průměr 1 : 78), přičemž po *i. m.* aplikaci vakcíny byla u dvou ze tří koček zjištěna vyšší hladina VNP. Kontrolní titrací CVS viru bylo zjištěno, že ve VNT bylo použito 20 LD₅₀ CVS viru. Výsledky jsou uvedeny v tab. II.

II. Stanovení PD₅₀ v sérech koček po vakcinaci proti vzteklině
Kvantitativní vyšetření jednotlivých vzorků

Aplikace	Kočka číslo	PD ₅₀ za 21 den po vakcinaci	Průměrná hodnota	PD ₅₀
<i>i. m.</i>	1	1 : 95	1 : 93	1 : 78
	2	1 : 125		
	7	1 : 60		
<i>s. c.</i>	8	1 : 15	1 : 62	
	3	1 : 45		
	4	1 : 125		
Kontrola		1 : 3		

SKOT

Skupina čtyř býčků ve váze 250 kg byla vakcinována avianizovanou vakcínou proti vzteklině Flury LEP v dávce 3, 6 a 9 ml *i. m.* do krční svaloviny. Druhá skupina tří býčků byla vakcinována stejným způsobem vakcínou Flury HEP. Krev byla odebírána před vakcinací a 30 dnů po ní. VNT nebyly zjištěny před vakcinací VNP. Za 30 dnů po vakcinaci byl zjištěn vysoký titr VNP v sérech vakcinovaných zvířat (PD₅₀ v ředění 1 : 106–1 : 109). Nebyl pozorován rozdíl mezi použitím vakcíny Flury LEP a HEP, rovněž různá vakcinační dávka nevyvolala rozdílnou výši VNP. Podle kontrolní titrace bylo ve VNT použito 44 LD₅₀ CVS viru (tab. III).

KOZY

V pokuse byly použity čtyři kozy. Dvě byly imunizovány avianizovanou vakcínou, dvě mozkomíšní vakcínou. V každé skupině byla jedna koza vakcinována *i. m.*, druhá s. c. Krev k VNT byla odebrána před vakcinací a 10 a 21 dnů po vakcinaci. V sérech koz před vakcinací nebyly zjištěny VNP. Za 10 dnů po vakcinaci byla již zjištěna v sérech všech zvířat vysoká hladina VNP (PD₅₀ v ředění 1 : 42–1 : 125). Titr protilátek byl po aplikaci mozkomíšní vakcíny vyšší než po aplikaci vakcíny avianizované. Za 21 den po vakcinaci byla zjištěna PD₅₀ v ředění 1 : 338–1 : 625. Kontrolní titrací bylo prokázáno, že ve VNT bylo použito 20 LD₅₀ (tab. IV).

III. Stanovení PD₅₀ v sérech skotu po vakcinaci avianizovanou vakcínou proti vzteklině

Kvantitativní vyšetření jednotlivých vzorků

Vakcína	Býk číslo	Aplikace	Dávka	PD ₅₀ za 30 dnů po vakcinaci	Průměrná hodnota
Flury LEP op. č. 140	191	<i>i. m.</i>	3	1 : 60	1 : 109
	192	<i>i. m.</i>	3	1 : 125	
	196	<i>i. m.</i>	6	1 : 125	
	194	<i>i. m.</i>	9	1 : 125	
Flury HEP op. č. 22a	63	<i>i. m.</i>	3	1 : 125	1 : 106
	67	<i>i. m.</i>	6	1 : 68	
	69	<i>i. m.</i>	9	1 : 125	

IV. Stanovení PD₅₀ v sérech koz po vakcinaci proti vzteklině

Vakcína	Dávka	Aplikace	Koz číslo	PD ₅₀ séra z odběru po vakcinaci za	
				10 dnů	21 den
Avianizovaná Flury LEP 244	3	<i>i. m.</i>	1	1 : 42	1 : 367
	3	<i>s. c.</i>	2	1 : 42	1 : 385
Mozkomišní op. č. 049	2	<i>i. m.</i>	3	1 : 125	1 : 625
	2	<i>s. c.</i>	4	1 : 75	1 : 338

PRASATA

Čtyři skupiny prasat byly vakcinovány *s. c.* různými vakcínami proti vzteklině. Za 10 dnů po vakcinaci byla všechna prasata revakcinována stejnou dávkou a stejným způsobem:

1. skupina: mozkomíšní vakcínou (dávka 2 ml),
2. skupina: mozkomíšní vakcínou s prošlou expirační dobou,
3. skupina: avianizovanou vakcínou (dávka 3 ml),
4. skupina: avianizovanou vakcínou s nevyhovující zkouškou účinnosti.

Protilátková odpověď byla zjišťována kvantitativním vyšetřením směsných vzorků všech prasat z každé skupiny. Před vakcinací nebyly u prasat VNP zjištěny. Za 10 dnů po vakcinaci byly VNP zjištěny jen v zanedbatelné výši (1 : 3—1 : 9). Za 21 den po vakcinaci (11 dnů po revakcinaci) byly zjištěny VNP v ředění séra 1 : 36—1 : 166 (u prasat 1. a 3. skupiny). U prasat 4. skupiny (nevyhovující zkouška účinnosti) ke tvorbě VN² n² o, u prasat 2. skupiny (prošla expirační doba) byl zjištěn titr 1 : 34. Vakcinace mozkomíšní vakcínou vyvolala vyšší tvorbu VNP (1 : 166) než avianizovanou vakcínou (1 : 36). Výsledky jsou uvedeny v tab. V.

V. Stanovení PD₅₀ v sérech prasat po vakcinaci proti vzteklině

Kvantitativní vyšetření směsných vzorků

Vakcína	Op. č.	Dávka	Aplikace	PD ₅₀ séra z odběru			Poznámka
				před vakcinací	po vakcinaci		
					10 dnů	21 den	
Avianizovaná	231	3	s. c.	0	1 : 4	1 : 36	*)
Flury LEP	181			0	1 : 3	1 : 4	
Mozkomíšní	049	2	s. c.	0	1 : 9	1 : 166	**)
	030			0	1 : 5	1 : 34	

*) Nevyhovující zkouška účinnosti při sériové kontrole

***) Vakcína s prošlou expirační dobou

OVCE

Ovce byla v intervalu 7 dnů třikrát imunizována mozkomíšní vakcínou v dávce 2 ml s. c. (hyperimunizace za účelem přípravy antirabického konjugátu). Krev byla odebrána 7, 14 a 30 dnů po první vakcinaci. Protilátková odpověď byla zjišťována kvantitativním stanovením PD₅₀ proti 56 LD₅₀ CVS viru. Za 7 dnů po vakcinaci byla PD₅₀ zjištěna v ředění 1 : 125, za 14 dnů po vakcinaci v ředění 1 : 202, za 30 dnů po vakcinaci 1 : 468.

KRÁLÍCI

Čtyři skupiny králíků po dvou zvířatech byly vakcinovány tak, že první skupina byla vakcinována podkožně, druhá nitrosvalově mozkomíšní vakcínou v dávce 2 ml. Třetí a čtvrtá skupina stejným způsobem avianizovanou vakcínou v dávce 3 ml. Protilátková odpověď byla zjišťována kvantitativním stanovením PD₅₀ proti 50 LD₅₀ CVS viru. Před vakcinací nebyly v sérech králíků zjištěny VNP. Za 10 dnů po vakcinaci byl zjištěn titr VNP v ředění 1 : 17—1 : 125, za 21 den po vakcinaci 1 : 265—1 : 625. Avianizovaná vakcína vyvolala vyšší tvorbu VNP než vakcína mozkomíšní. Rovněž při i. m. aplikaci vakcíny byl titr VNP vyšší než při s. c. aplikaci.

MORČATA

Skupina čtyř morčat byla imunizována mozkomíšní vakcínou s. c. v dávce 0,25 ml, druhá skupina avianizovanou vakcínou i. m. v dávce 0,25 ml. Imunizace byla stejným způsobem opakována za 7 a 14 dnů po první vakcinaci. (Hyperimunizace za účelem přípravy antirabického konjugátu.) Kvantitativní metodou proti 40 LD₅₀ CVS viru byla zjištěna PD₅₀ v ředění: 14 dnů po první vakcinaci 1 : 125, za 28 dnů 1 : 625. Nebyl zjištěn rozdíl ve tvorbě VNP u obou druhů vakcín.

DISKUSE

Aplikace obou vakcín (avianizované a mozkomíšní) vyvolala u všech pokusných zvířat tvorbu virusneutralizačních protilátek v dostatečné výši, zaručující solidní imunitu vakcinovaných zvířat. Po vakcinaci psů avianizovanou

VI. Stanovení PD₅₀ v sérech králíků po vakcinaci proti vzteklině

Kvantitativní stanovení jednotlivých vzorků

Vakcína	Applikace	Dávka	Králík číslo	PD ₅₀ séra z odběru		
				před vakcinací	po vakcinaci	
					10 dnů	21 den
Avianizovaná Flury LEP 01	<i>i. m.</i>	3	408	0	×	1 : 625
	<i>i. m.</i>	3	681	0	1 : 125	1 : 625
	<i>s. c.</i>	3	688	1 : 3	1 : 57	1 : 625
	<i>s. c.</i>	3	690	0	×	1 : 625
Mozkomišní op. č. 043	<i>i. m.</i>	2	695	0	1 : 94	×
	<i>i. m.</i>	2	698	1 : 5	×	1 : 474
	<i>s. c.</i>	2	691	0	1 : 17	1 : 265
	<i>s. c.</i>	2	700	0	×	1 : 625

vakcínou Flury LEP jsme zjistili 50% chráněnost séra v ředění 1 : 92 (1 : 38—1 : 125). V sérech některých psů zjištěné nízké titry VNP (1 : 2—1 : 10) z odběru před vakcinací je třeba hodnotit jako titry zanedbatelné, neovlivňující tvorbu VNP po vakcinaci. C a b a s s o a kol. (1965) při použití tkáňové vakcíny Flury LEP k ověření dosažených výsledků infikoval všechny pokusné psy uličním virem vztekliny. Při zjištěné PD₅₀ (1 : 16—1 : 128) všichni vakcinovaní psi čelenž přežili. M o s e l e y a kol. (1968) prokazoval protilátky po inokulaci Flury kmene za dva týdny po aplikaci a prokazoval je po celou dobu sledování, tj. 42 dny. Při našich pokusech jsme zjistili VNP po aplikaci avianizované vakcíny rovněž za 14 dnů a za 90 dnů po vakcinaci byly ještě vysoké (1 : 30—1 : 125). Nástup tvorby VNP nebyl u různých druhů zvířat shodný. U koz a ovcí byly VNP zjištěny v dostatečné výši za 10 dnů po vakcinaci, zatímco u prasat jen nepatrné. Rovněž u psů nebyly VNP 8 dnů po vakcinaci zjištěny. Aplikace mozkomíšni vakcíny vyvolala u koz vyšší tvorbu VNP (1 : 75—1 : 625) než aplikace vakcíny avianizované (1 : 42—1 : 385). Naopak u králíků byl titr VNP po avianizované vakcíně vyšší než po mozkomíšni. M e r r y a kol. (1969) při vakcinaci psů Flury vakcínou zjistili stejnou chráněnost po *s. c.* i po *i. m.* aplikaci. Rovněž v našich pokusech nebyl u psů zjištěn rozdíl v tvorbě VNP po *i. m.* nebo *s. c.* aplikaci. U koček a koz však byla hladina VNP po *i. m.* aplikaci vakcíny vyšší než po *s. c.* Hodnoty PD₅₀ zjištěné v našich pokusech při použití komerčně vyrobených protivzteklínových vakcín jsou vysoké, odpovídají zahraničním údajům a svědčí o dobré kvalitě vakcín proti vzteklině, vyráběných v ČSSR.

Literatura

- ATANASIU P., 1967, Titrage des anticorps rabiques pratiqués sur les serums humains. Office international des épizooties, LXVII, 3-4 : 383-387.
BOURDIN P., SUREAU P., 1965, Sur l'efficacité de la vaccination antirabique des chiens avec le vaccin Flury LEP à Madagascar. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux XVIII, 3 : 243-246.

- CABASSO V. J. a kol., 1965, Tissue Culture Rabies Vaccine (Flury LEP) in Dogs. Amer. Journ. of Veterinary Research 26, 110 : 24-32.
- ČUPERA Z., 1969, Titrace účinnosti vakcíny proti vzteklině v ČSSR se zaměřením na avianizovanou vakcínu Flury LEP. Vet. Med. (Praha) 14, 7 : 393-400.
- FUENZALIDA E., 1967, Estado actual de desarrollo de la vacuna antirábica preparada de cerebros de ratones lactantes en Latinoamérica. XVIII. Congrès mondial vétérinaire 1 : 223-226.
- JOHNSON H. N., 1966, The serum virus neutralization test. Laboratory techniques in rabies, W. H. O., Geneva.
- KESIČ, ZDRAVKO L., 1967, Prilog poznavanju imunogenih osobina atenuiranog virusa besnila flury soja u adnosu na imunogena svojstva inaktivisanog virusa fixa. Acta veterinaria 17, 4 : 481-490.
- LAWSON K. F. a kol., 1967, ERA strain rabies vaccine. Duration of immunity in cattle, dogs and cats. Veterin. med. Smal. animal Clinician. November, 62, 11 : 1073-1074.
- MERRY D. a kol., 1969, Subcutaneous vs. intramuscular inoculation of dogs. Vet. Med. and Small. Animal Clin. 64,8 : 675-679.
- MOSELEY B. L. a kol., 1968, Responses in dogs exposed to attenuated rabies virus. Amer. Journ. veter. Research 29, 11 : 2113 : 2118.
- ORLAND A., LOAVE B. S., 1964, Viability of LEP modified Live-virus Rabies Vaccine Following Three and Five Years of storage. Journ. of the Americ., vet. med., Ass 144, 4 : 387-388.
- OTT G. L., CARLSON W. E., 1960, Potency testing of live modified rabies vaccine. Vet. med. 55 : 45-48.
- SELIMOV M. A., KLJUEVA E. V., 1969, Method to determine the immunogenic activity of antirabies vaccine with street virus of rabies in mice. Veterinársky časopis 12 (3-4) : 123-126.
- STAROŠTÍK L., ČUPERA Z., 1970, Zhodnocení pokusné kombinované vakcíny proti leptospiróze a vzteklině psů. Veterinářství XX, 4 : 154-157.
- ŠNOFLÁK J. a kol., 1970, Ověřování účinnosti antirabických vakcín vyrobených z viru pomnoženého na kuřecích embryích. Závěrečná zpráva, A-0-13-34/3.
- , 1966, Laboratory techniques in rabies. W. H. O., Genève.

Došlo dne 15. 9. 1971

ЧУПЕРА З. (Институт государственного контроля ветеринарных биопрепаратов и лекарств, Брно, отделение биопрепаратов, Ивановице-на-Гане, Чехословакия). Антителовая реакция животных на применение вакцины против vch sctar. Vet. Med. (Praha) 17, (4) : 233-242, 1972.

Изучался уровень вирус-нейтрализующих антител в сыворотках животных после применения авианизированной и спинномозговой вакцины против бешенства. Были использованы операционные числа коммерчески изготавливаемых вакцин которые были применены в обычных вакцинационных дозах, а именно как методом внутримышечного, так и подкожного впрыскивания. Оценка производилась с помощью вирус-нейтрализующего теста на мышах путем определения 50% защищенности разбавления сыворотки (PD₅₀) против постоянной дозы фиксированного вируса бешенства штамма CVS. Применение обеих вакцин вызвало у животных образование вирус-нейтрализующих антител в достаточном размере, обеспечивающем прочный иммунитет вакцинированных животных. У собак не было установлено различий в образовании вирус-нейтрализующих антител при внутримышечном или подкожном введении вакцины. У кошек и коз, однако, уровень антител после внутримышечного введения был выше, чем при подкожном впрыскивании. Применение спинномозговой вакцины вызвало у коз повышенное образование антител, чем применение авианизированной вакцины. Напротив, у кроликов титр антител был выше после применения авианизированной вакцины в сравнении со спинномозговой вакциной. Установленные величины PD₅₀ после применения вакцин против бешенства высокие и отвечают литературным данным других авторов: авианизированная вакцина: собаки 1 : 52—1 : 95, крупный рогатый скот 1 : 106—1 : 109, козы 1 : 367—1 : 385, свиньи 1 : 36, кролики 1 : 265—1 : 625, морские свинки 1 : 625.

вирус-нейтрализующие антитела; авианизированная вакцина; спинномозговая вакцина; впрыскивание внутримышечное и подкожное; вирус нейтрализующий тест на мышах

ČUPERA Z. (Institute for the State Checking of Veterinary Biopreparations and Drugs, Brno, Sector of Biopreparations, Ivanovice na Hané, Czechoslovakia). *The Antibody Response of Animals to the Application of the Antirabic Vaccine*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 233-242, 1972.

Examined was the level of virus-neutralizing antibodies in the sera of animals after application of avianized and cerebrospinal vaccine against rabies. Used were the operational figures of commercially produced vaccines, which were applied in the current vaccination doses, and that both by means of the *i. m.* and *s. c.* methods. Evaluation was carried out by means of the virus neutralization test with mice with a determination of a 50 per cent protection of the dilution of the serum (PD₅₀) against a constant dose of the fixed virus of rabies of the CVS strain. The application of both vaccines caused in the animals the forming of virus-neutralizing antibodies at a sufficient height, guaranteeing a solid immunity of the vaccinated animals. In dogs no difference was found in the forming of virus-neutralizing antibodies in the case of *i. m.* or *s. c.* application of the vaccine. In cats and goats, however, the antibody level after *i. m.* application was higher than after *s. c.* application. In goats the application of cerebrospinal vaccine caused a greater forming of antibodies than did application of avianized vaccine. In rabbits, on the other hand, the antibody titre was higher after avianized vaccine than after the cerebrospinal vaccine. The PD₅₀ values ascertained after the application of the antirabic vaccine are high and correspond to the literary data submitted by other authors: avianized vaccine: dogs 1:52—1:95, cattle 1:106—1:109, goats 1:367—1:385, pigs 1:36, rabbits 1:625, guinea-pigs 1:625; cerebrospinal vaccine: cats 1:78, goats 1:338—1:625, pigs 1:166, sheep 1:468, rabbits 1:265—1:625, guinea-pigs 1:625.

virus-neutralizing antibodies; avianized vaccine; cerebrospinal vaccine; *i. m.* and *s. c.* application; virus-neutralizing test performed with mice

ČUPERA Z. (Institut für Staatskontrolle von Veterinärbiopreparaten- und Medikamenten, Brno, Hauptabteilung Biopreparate, Ivanovice na Hané, Tschechoslowakei). *Antikörperantwort der Tiere auf Applikation von Vakzinen gegen Tollwut*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 233-242, 1972.

Es wurde der Spiegel der virusneutralisierenden Antikörper in Seren der Tiere nach Applikation einer avianisierten zerebrospinalen Vakzine gegen Tollwut untersucht. Es wurden Operationsnummern der handelsweise erzeugten Vakzinen, die zu den üblichen Vakzinationsdosen sowohl auf die *i. m.* als auf die *s. c.* Weise appliziert wurden, benützt. Ausgewertet wurde mittels eines virusneutralisierenden Tests auf Mäusen durch Festlegung des 50%igen Schutzes der Serumverdünnung (PD₅₀) gegen eine konstante Gabe des fixen Tollwutvirus des CVS-Stammes. Die Applikation der beiden Vakzinen löste bei den Tieren die Bildung von virusneutralisierenden Antikörpern in einer genügenden, eine solide Immunität der vakzinieren Tiere gewährenden Höhe aus. Bei Hunden wurde kein Unterschied in der Bildung von virusneutralisierenden Antikörpern bei einer *i. m.* oder *s. c.* Applikation der Vakzine festgestellt. Jedoch bei Katzen und Ziegen war der Antikörperspiegel nach der *i. m.* Applikation höher als nach der *s. c.* Applikation. Die Applikation der zerebrospinalen Vakzine rief bei Ziegen eine höhere Antikörperbildung als die Applikation der avianisierten Vakzine hervor. Dagegen bei Kaninchen war der Antikörpertiter nach der avianisierten Vakzine höher als nach der zerebrospinalen Vakzine. Die nach der Applikation der Gegentollwutvakzinen festgestellten PD₅₀-Werte sind hoch und entsprechen den literarischen Angaben der anderen Autoren: avianisierte Vakzine: Hunde 1:52—1:95, Rindvieh 1:106—1:109, Ziegen 1:367—1:385, Schweine 1:36, Kaninchen 1:625, Meerschweinchen 1:625; zerebrospinale Vakzine: Katzen 1:78, Ziegen 1:338—1:625, Schweine 1:166, Schafe 1:468, Kaninchen 1:265—1:625, Meerschweinchen 1:625.

virusneutralisierende Antikörper; avianisierte Vakzine; zerebrospinale Vakzine; *i. m.* und *s. c.* Applikation; virusneutralisierender Test auf Mäusen

Adresa autora:

MVDr. Z. Čupera, Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Ivanovice na Hané

HETEROGENITA ARYLAMIDÁZ ŠTIEPIACICH L-LEUCYL-P-NITROANILID V KRVNÝCH SÉRACH HOSPODÁRSKÝCH ZVIERAT

A. Šamo, M. Bartík

Vysoká škola veterinárska, katedra chémie, biochémie a toxikológie, Košice

ŠAMO A., BARTÍK M. *Heterogenita arylamidáz štiepiacich L-leucyl-p-nitroanilid v krvných sérach hospodárskych zvierat.* Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 243-248, 1972.

Autori sledovali zastúpenie sérových enzýmov hydrolyzujúcich L-leucyl-p-nitroanilid u ošipáných, oviec, koní a hovädzieho dobytku. Agarovou elektroforézou krvných sér zdravých jedincov zistili dve frakcie arylamidázy, lokalizované v α_1 a α_2 globulínovej oblasti. U oviec bol študovaný vplyv jednorázového perorálneho podania chloridu uhličitého na zmenu aktivity sérových frakcií arylamidázy. Bolo zistené signifikantné zvýšenie hladiny pomalšie putujúcej frakcie, ktoré dosiahlo maximum medzi 24. až 48. hodinou od aplikácie a po zvolne počas siedmich dní kleslo na hodnotu pred pokusom.

arylamidázy; otrava CCl_4 ; enzymatická diagnostika

Heterogenita leucínaminopeptidázy a neskôr od nej odčlenenej arylamidázy v ľudských orgánoch a v krvnom sére bola známa už dávnejšie (Meade, Rosalki 1964, Schobel, Wewalka 1962). Taktiež u malých laboratórnych zvierat sa zistila použitím rôznych separačných metód nehomogenosť enzýmu štiepiaceho syntetické substráty (Mäkinen, Raekallio 1969, Monis 1965, Patterson a kol. 1965). Avšak prakticky úplne chýbajú tieto poznatky o vlastnostiach arylamidáz u hospodárskych zvierat.

Vzrast celkovej aktivity sérovej arylamidázy (leucínaminopeptidázy) pri tehotenstve (Goebelsman, Beller 1965, Hanson a kol. 1963) a rôznych chorobách v humánnej medicíne pozorovali viacerí autori (Bressler a kol. 1960, Rutenburg a kol. 1962, 1964). Vo veterinárstve bolo zistené zvýšenie aktivity arylamidázových enzýmov v krvnom sére oviec po perorálnom podaní CCl_4 (Bartík, Michnová 1967) a u prasiat s bronchopneumóniou (Šlesinger 1966). Použitím elektroforetických metód pri sledovaní vlastností arylamidáz v tehotenstve bol zistený rozdiel vo výskyte a aktivite jednotlivých frakcií oproti normálnemu netehotenskému stavu (Glendenning a kol. 1965, Kleiner, Schram 1966, Page a kol. 1961). Podobne boli pre niektoré ochorenia nájdené špecifické elektroforetické obrazce a navrhnuté pre diagnostické účely (Kowlessar a kol. 1960, Schobel, Wewalka 1962).

Cieľom tejto práce bolo určiť normálne hodnoty frakcií arylamidáz štiepiacich L-leucyl-p-nitroanilid v krvných sérach hospodárskych zvierat a na mode-

lovom pokuse s podaním chloridu uhličitého ovciam sledovať zmeny týchto sérových frakcií. Týmto chceme poukázať na vhodnosť použitia danej metodiky pre určovanie, resp. upresnenie enzymatickej diagnostiky aj vo veterinárskej medicíne.

MATERIÁL A METÓDY

Sérum hovädzieho dobytku a ošípaných bolo získané z krvi odobratej pri porážke týchto zvierat na bitúnku. Konské a ovčie sérum pochádza zo zvierat fakultných kliník. Krv bola braná zo zdravých jedincov, hneď spracovaná a sérum uskladňované v chladničke pri teplote asi 4 °C. L-leucyl-p-nitroanilid bol syntetizovaný ing. Kasáňikom v Ústave pre farmáciu a biochémiu v Prahe. Na elektroforézu bol používaný DIFCO BACTO-AGAR. Ostatné použité chemikálie boli čistoty *p. a.*

Elektroforetické delenie arylamidáz v krvných sérach sme prevádzali v špeciálnych kamerách podľa Večerka a kol. (1968). Na prípravu deliacich platničiek bol použitý 1,5% DIFCO agar, ktorý bol varený s veronal-citrátovým pufrum o pH 8,1 a $\mu = 0,05$. Delenie prebiehalo za chladu 2,5 hodiny pri svorkovom napätí 100 V a intenzite 12 mA.

Na detekciu frakcií arylamidáz bola použitá modifikovaná metóda Wintersbergera a Tuppeho (Wintersberger, Tuppy 1960). L-leucyl-p-nitroanilid ako substrát mal výslednú koncentráciu $1,3 \cdot 10^{-3}$ M. Inkubovalo sa tri hodiny pri 37 °C. Po ukončení inkubácie bolo žlté pozadie prúžku vymývané vodou. Percentuálne zastúpenie jednotlivých frakcií arylamidáz sa vyhodnotilo v nesusušenom prúžku na extinkčnom registračnom fotometri ERI 10.

Pre určenie aktivity získaných frakcií sa merala celková aktivita arylamidázy v sére. Zloženie inkubačnej zmesi je nasledovné (Bartík, Michnová 1967): 0,2 ml krvného séra, 0,7 ml 0,02 M fosfátového pufru o pH 7,5, 0,1 ml 0,01 M L-leucyl-p-nitroanilidu.

Inkubovalo sa 30 minút pri teplote 30 °C. Reakcia sa zastavila znížením pH po pridaní 0,5 ml 0,1 N HCl. Extincia odštiepeného p-nitroanilínu pri 400 m μ je udávaná v μ g p-nitroanilínu v 1 ml/min. pri 30 °C.

Pre sledovanie účinku chloridu uhličitého na zmenu aktivity sérových frakcií arylamidáz u oviec bolo vybratých 10 zdravých kusov; boli ustajnené mimo stáda. Dva dni pred aplikáciou sa stanovovali hodnoty izoenzymov pre porovnanie s normálmi. Chlorid uhčitý bol podaný *per os* v množstve 0,5 ml na kilogram živej váhy. Krv bola odoberaná po 24hodinových intervaloch a hneď spracovaná. Na stanovenie frakcií arylamidáz bola použitá tá istá metodika ako pri určovaní normálnych hodnôt.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

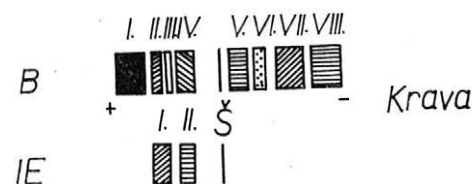
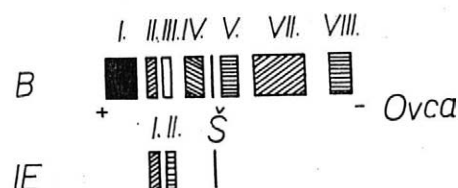
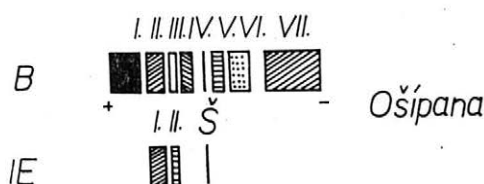
V našej práci sme sa pokúsili o kvalitatívne aj kvantitatívne stanovenie jednotlivých frakcií arylamidázy v krvných sérach hospodárskych zvierat po elektroforetickom rozdelení v agarovom géli. Robili sme série po 8 kusov u každého druhu zvierat (ovce, kone, hovädzí dobytok, ošípané). Celková aktivita a hodnoty aktivít získaných frakcií arylamidázy sú v tab. I. Aktivity u jednotlivých frakcií boli vypočítané podľa percentuálneho zastúpenia po vyhodnotení na ERI 10 z celkovej aktivity v sére.

I. Celková aktivita arylamidáz a aktivita jednotlivých enzýmových frakcií v krvných sérech hospodárskych zvierat

Frakcie	Ošipané <i>n</i> = 8 μg PNA	Ovce <i>n</i> = 8 μg PNA	Kone <i>n</i> = 8 μg PNA	Hovädzi dobytok <i>n</i> = 8 μg PNA
1.	88 ± 7	120 ± 3	58 ± 2	71 ± 2
2.	215 ± 7	32 ± 3	20 ± 2	13 ± 2
Celková aktivita	303 ± 24	152 ± 18	78 ± 12	84 ± 16

Aktivita vyjadrená v μg p-nitroanilínu (PNA) na ml/min. pri 30 °C

Detekciu škvrn arylamidázy sme najprv prevádzali metódou podľa Rybáka a kol. (1967). Tento spôsob sa nám ukázal ako nevhodný, pretože frakcie boli veľmi málo ostré (rozdifundované). Neskôr sme prešli na vyfarbovanie frakcií pomocou diazóniovej soli Fast Garnet Salt GBC podľa Wintersbergera a Tuppeho (1960). Túto metódu sme však museli upraviť, lebo pri ním udanej koncentrácii substrátu boli pružky arylamidázy slabo viditeľné. Okrem toho sme ako substrát používali L-leucyl-p-nitroanilid.

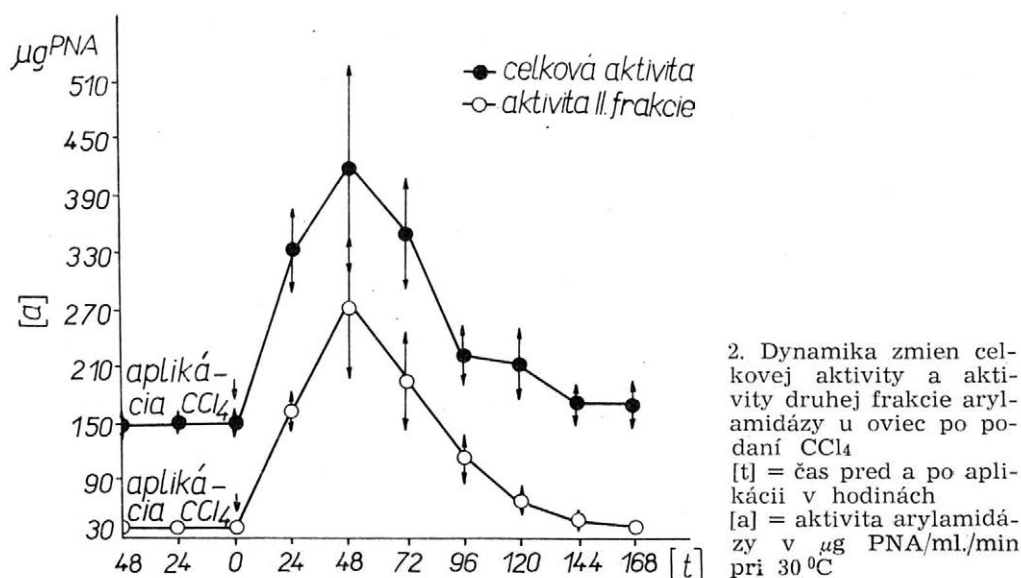


1. Lokalizácia frakcií sérovej arylamidázy oproti bielkovinnému spektru
B — bielkoviny, IE frakcie arylamidázy,
Š — štart

U oviec, koní, hovädzieho dobytku a ošípaných sme dostali dve frakcie arylamidázy, avšak u hovädzieho dobytku je prvá frakcia pomerne široká; je možné, že sa tu jedná o frakcie dve, čo by potvrdzoval elektroforetografický záznam. Nami dosiahnuté výsledky u zvierat sú zhodné s výsledkami, ktoré boli robené u ľudí (Nakagawa, Tsuji 1966). Avšak treba mať na zreteli, že boli použité rozdielne metodiky a substráty.

Lokalizácia frakcií arylamidázy oproti bielkovinnému spektru je schématicky znázornená na obr. 1. Obidve frakcie u všetkých druhov zvierat sú na anodickej strane v oblasti α_1, α_2 globulínov.

Ďalej sme sledovali vplyv podania chloridu uhličitého na zmenu aktivity sérových frakcií arylamidázy u oviec. Zistili sme, že po podaní chloridu uhličitého *per os* sa zvyšuje celková aktivita sérovej arylamidázy. Maximum dosiahne po dvoch dňoch, potom klesá a na štvrtý až piaty deň dosiahne hodnotu pred pokusom (Bartík, Michnová 1967). Pri sledovaní enzymových frakcií sa prejaví markantné zvýšenie aktivity u druhej (pomalšie putujúcej) frakcie. Časový priebeh zmeny celkovej aktivity a hladiny druhej frakcie je na obr. 2. Maximum sa dosiahne po 48 hodinách a klesne po 168 hodinách na hodnotu pred podaním.



Toto zistenie by mohlo hovoriť o pôvode druhej enzymovej frakcie v pečeni, no nemožno to jednoznačne tvrdiť. Pre doriešenie tejto otázky bude potrebné stanoviť elektroforeticky arylamidázy v homogenátoch orgánov.

Literatúra

- BARTÍK M., MICHNOVÁ E., 1967, Možnosti použitia peptidolytických enzýmov v diagnostike. Veterinárství 17 : 263-265.
BRESSLER R., FORSYTH B. R., KLATSKIN G., CONN N. H., 1960, Serum leucine aminopeptidase activity in hepatobiliary and pancreatic disease. J. Lab. Clin. Med. 56 : 417-430.
GLENDENING M. B., TITUS M. A., SCHROEDER S. A., MOHUN G., PAGE E. W., 1965, The destruction of oxytocin and vasopressin by the aminopeptidase in sera from pregnant women. Amer. J. Obstet. Gynecol. 92 : 814-820.

- GOEBELSMAN U., BELLER F. K., 1965, Separation of cystine-aminopeptidase and leucine-amino-peptidase and their determination in pregnant and nonpregnant women. *Z. Klin. Chem.* 3 : 49-54.
- HANSON H., BOHLEY P., MANNSELDT H. G., 1963, Zur Verwendung von L-Leucin- β -Naphthylamid als spezifisches Substrat für Bestimmungen von Leucin-aminopeptidase. *Clin. Chim. Acta* 8 : 555-564.
- KLEINER H., SCHRAM E., 1966, Séparation des izozymes hydrolysant la l-leucyl- β -naphthylamide par électrophorèse verticale en gel d'acrylamide. *Clin. Chim. Acta.* 14 : 377-385.
- KOWLESSAR O. D., HAEFFNER L. J., SLEISENGER M. H., 1960, Localization of leucine aminopeptidase in serum and body fluids by starch gel electrophoresis. *J. Clin. Invest.* 39 : 671-675.
- MAKINEN P. L., RAEKALLIO J., 1969, Characterization of four arylaminopeptidases of rat skin. *Enzymologia* 36 : 93-110.
- MEADE B. W., ROSALKI S. B., 1964, Localization of leucine aminopeptidase isoenzymes. *J. Clin. Pathol.* 17 : 61-63.
- MONIS B., 1965, Isozymes of arylamidase (Amino-peptidase): Source of blood aminoacyl naphthylamidase in the rat. *Nature* 208 : 587-588.
- NAKAGAWA S., TSUJI H., 1966, Multiplicity of leucinamide-splitting enzymes in normal and hepatitis sera. *Clin. Chi. Acta* 13 : 155-160.
- PAGE E. W., TITUS M. A., MOHUN G., GLENDENING M. B., 1961, The origin and distribution of oxytocinase. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 82 : 1090-1095.
- PATTERSON E. K., SHU-HSI HSIAO—KEPPEL A., SOROF S., 1965, Studies on dipeptidases and amino-peptidases. II. Zonal electrophoretic separation of rat liver peptidases. *J. Biol. Chem.* 240 : 710-716.
- RUTENBURG A. M., BANKAS B. M., PINEDA E. P., GOLDBARG J. A., 1964, A comparison of serum amino-peptidase and alkaline phosphatase in the detection of hepatobiliary disease in anicteric patients. *Ann. Inter. Med.* 61 : 50-55.
- RUTENBURG A. M., PINEDA E. P., GOLDBARG J. A., LEVITAN R., GELLIS S. S., SILVERBERG M., 1962, Serum leucine amino-peptidase: Activity in normal infants, in biliary atresia and in other diseases. *Amer. J. Dis. Child.* 103 : 47-54, cit. podřa COLMAN R. W., 1965.
- RYBÁK M., PETÁKOVÁ M., SIMONIANOVÁ E., 1967, Cleavage of glycine, alanine and leucine-p-nitroanilides by some animal arylamino-peptidases. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* 32 : 1051-1057.
- SCHOBEL B., WEWALKA F., 1962, Die Heterogenität der Leucinamino-peptidase. Untersuchungen von Organen und Serum bei Leber-, Gallen- und Pankreas-erkrankungen. *Klin. Wochenschr.* 40 : 1048-1056.
- ŠLESINGER L., 1966, Untersuchungen über die Aktivität der Leucinamino-peptidasen im Blutserum einiger Haustiere. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 21 : 778-780.
- VEČEREK B., ŠTĚPÁN J., HYNIE I., KÁCL K., 1968, Micromodification of quantitative electrophoresis in agar gel. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* 33 : 141-147.
- WINTERSBERGER E., TUPPY M., 1960, Zonen-Elektrophorese von Amino-peptidasen in Stärkegel. *Mh. Chem.* 91 : 406-411.

Dořlo dne 22. 3. 1971

ШАМО А., БАРТИК М. (Ветеринарный институт, кафедра химии, биохимии и токсикологии, Кошице, Чехословакия). Гетерогенность ариламидаз, расщепляющих Л-лейцил-п-нитроанилид в кровяных сыворотках сельскохозяйственных животных. *Vet. Med. (Praha)* 17 (2) : 243-248, 1972.

Авторы изучали содержание сывороточных ферментов гидролизующих Л-лейцил-п-нитроанилид у свиней, овец, лошадей и крупного рогатого скота. При помощи агарового электрофореза сывороток крови здоровых особей установлены 2 фракции ариламидазы, локализованные в $\alpha 1$ и $\alpha 2$ области глобулина. У овец изучали влияние однократового перорального введения хлоруглерода на изменение активности сывороточных фракций ариламидазы. Установлено значимое повышение уровня медленно движущейся фракции с максимумом между 24.—48. час. с начала введения, который постепенно падал в течение 7 дней, достигая величины до начала опыта.

ариламидазы; отравление ССІ4; ферментная диагностика

ŠAMO A., BARTÍK M. (University of Veterinary Medicine, Department of Chemistry, Biochemistry and Toxicology, Košice, Czechoslovakia). *The Heterogeneity of Arylamidases Cleaving L-leucyl-p-nitroanilide in the Blood Serum of Farm Animals*. Vet. Med. (Praha) 17 (2) : 243-248, 1972.

The authors studied the presence of serum enzymes hydrolyzing L-leucyl-p-nitroanilide in pigs, sheep, horses and cattle. Agar electrophoresis of the blood serum of healthy individuals revealed two fractions of arylamidase localized in α_1 and α_2 globulin regions. Sheep were studied for the effect of the peroral application of a single dose of tetrachlormethane on the change of the serum fractions of arylamidase. A significant increase was observed in the level of the slowly travelling fraction which reached its maximum between the 24th and 48th hours from application, and decreased slowly to the value before the test; this slow decrease took seven days.

arylamidase; CCl₄ poisoning; enzymatic diagnosis

ŠAMO A., BARTÍK M. (Veterinärhochschule, Lehrstuhl für Chemie, Biochemie und Toxikologie, Košice, Tschechoslowakei). *Heterogenität der das L-Leuzyll-p-Nitroanilid in Blutseren der landwirtschaftlichen Nutztiere spaltenden Arylamidasen*. Vet. Med. (Praha) 17 (2) : 243-248, 1972.

Die Autoren verfolgten die Vertretung der das L-Leuzyll-p-Nitroanilid hydrolysierenden Serumenzyme bei Schweinen, Schafen, Pferden und Rindvieh. Mit einer Agarelektrophorese der Blutseren von gesunden Einzeltieren ermittelten sie zwei in α_1 und α_2 des Globulingebietes lokalisierten Arylamidasenfraktionen. Bei Schafen wurde der Einfluß einer einmaligen peroralen Verabreichung von Kohlenstofftetrachlorid auf die Aktivitätsänderung der Arylamidasenserumfraktionen untersucht. Es wurde eine signifikante Spiegelerhöhung der sich langsamer bewegenden Fraktion, die das Maximum zwischen der 24.—48. Stunde nach der Applikation erreichte und langsam im Verlaufe von sieben Tagen auf den Wert vor dem Experiment herabsank, ermittelt.

Arylamidasen; CCl₄-Vergiftung; enzymatische Diagnostik

Adresa autorov:

A. Šamo, prof. MVDr. M. Bartík, DrSc., Vysoká škola veterinárska, katedra chémie, biochémie a toxikológie, Košice, Komenského 71

ZAVEDENIE KATÉTRA DO ARTERIA CAROTIS COMMUNIS DEXTRA U KRÁLÍKA

R. Príbyš

Lékařská fakulta KU, katedra patologické fyziologie, Hradec Králové

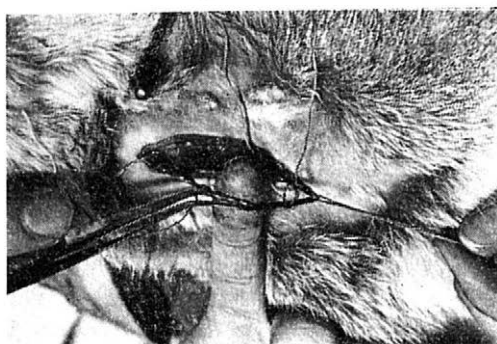
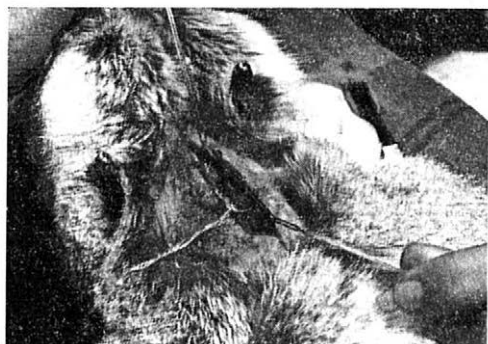
PRÍBYŠ R. Zavedenie katétra do arteria carotis communis dextra. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 249-252, 1972.

Práca detailne popisuje zavedenie polyetylénového katétra do arteria carotis communis dextra u králikov a nasledovné odoberanie vzoriek krvi pomocou zavedeného katétra.

katetrizácia; a. carotis communis; králik

Pri sledovaní hypoglykemického účinku inzulínu u králikov sme v začiatočných pokusoch krv na zisťovanie glykémie odoberali obvyklým spôsobom, tj. z ramus lateralis venae marginalis auriculae magnae. Tento spôsob sa ukázal ako nevyhovujúci, najmä po dostavení sa hypoglykemických kŕčov, kedy potrebné množstvo krvi 0,1 ml sa darilo veľmi ťažko získať aj po vyvolaní arteriálnej hyperémie ušnice či už jej fyzikálnym alebo chemickým podráždením. Arteriálnu hyperémiu ušnice sme vyvolávali jej masážou, ponorením do vody teplej 37–40 °C, potretím 5% vodným roztokom pentotalu alebo benzénom. Krv získaná po niektorej z uvedených procedúr bola veľmi odkysličená, takže získané výsledky boli zkreslené a nehodnotiteľné. Preto sme pristúpili k odoberaniu vzorkov krvi z arteria carotis communis dextra pomocou zavedeného katétra, ktorý sme jak pri akútnych, tak aj pri chronických pokusoch nijako nesterilizovali. Ako katéter sme používali lekársku hadičku z PVC o polomere 1,0 mm, ktorú vyrába národný podnik Fatra Napajedla. Kateter je dlhý 20–25 cm, na distálnom konci (ktorým sa zavádza do lumina krčnice) mierne šikmo zostrihaný; je naplnený roztokom heparínu vo fyziologickom roztoku. Koncentrácia heparínu nami používaná je 400 m. j./1 ml. Počas prvých dvoch rokov sme králikom vždy jeden deň pred operáciou na ventrálnej strane krku ošklbali srst. Posledné tri roky sme od tohoto spôsobu upustili — v deň operácie srst na mieste operačného poľa ostríháme. Operačné pole sme nikdy nedezinfikovali a podľa našich niekoľkoročných skúseností môžeme potvrdiť, že táto rana sa hojí per primam intentionem. Používali sme králiky druhu šedá činčila oboch pohlaví vo váhe 1,8–3,5 kg. Mladšie králiky, tj. s váhou menšou ako 1,8 kg, sme nepoužívali. Práca bola doposiaľ urobená na viac ako 500 králikoch. Úmrtia králikov sme mali iba v začiatočných pokusoch, to znamená v priebehu prvého roka a obyčajne boli zapríčinené buď príliš rýchlym intravenóznym podaním pentotalu, alebo ak bol katéter zavedený až do srdca. Operácia bola robená v intravenózne pentotalovej narkóze: 0,6–0,8 ml 5% vodného roztoku Pentotal Sodium Abbot, t. j. dávka 13,3–13,6 mg pentotalu/1 kg.

Po prerezaní kože, fascií a svalstva na krku — asi 0,5 cm paratracheálne vpravo v dĺžke 3 až 4 cm — bola vypreparovaná *arteria carotis communis dextra*. Pre ľahšie zavedenie katétra je dôležité poriadne izolovanú časť krčnej tepny očistiť od okolitého pojiva. Potom sa pod izolovanú krčnicu podvlečú tri hodvábne podväzy, z ktorých sa prvý — pokiaľ možno čo najkranialnejšie — liguje dvoma chirurgickými uzlami a na zostávajúcich dvoch podväzoch sa pripraví po jednom nedotiahnutom uzle. Operatér ľavou rukou za najkranialnejší podváz povytiahne krčnicu nad rovinu operačného rezu a pod ňu zasunie posledný článok malíka pravej ruky. Asistent napnutím najkaudálnejšieho podväzu preruší krvný prítok (obr. 1). Potom operujúci po pustení najkranialnejšieho podväzu hrotom očných nožničiek prestrihne stenu karotídy uprostred v smere jej pozdĺžnej osi do dĺžky 3—5 mm. Cez tento otvor zasunie do lumenu krčnice hroty zubárskej pinzety, ktoré mierne rozovrie (obr. 2) a asistent medzi hroty zubárskej pinzety zasunie distálny koniec katétra až po najkaudálnejšiu ligatúru. Operatér vytiahne z karotídy pinzetu, vysunie malík pravej ruky. Stenu cievy so zavedenou časťou katétra chytí medzi posledný článok palca a ukazováka pravej ruky. Do druhej ruky tým istým spôsobom vezme vyčnievajúcu časť katétra. Až potom asistent povolí najkaudálnejší podváz a operatér pozvoľna zasúva katéter smerom k srdcu do vzdialenosti 3—4 cm.



1. Izolovaná *a. carotis communis dextra* vytiahnutá nad rovinu operačného rezu

2. Zasunutú hroty zubárskej pinzety do lumenu karotídy

Podržanie časti zasunutého katétra palcom a ukazovákom pravej ruky je dôležité najmä vtedy, ak lumen karotídy je širší ako priemer katétra, lebo nárazom krvného prúdu pri systole srdca katéter môže byť vymrštený z tepny von. Najkaudálnejšia a prostredná ligatúra sa dotiahnu dvoma chirurgickými uzlami. *Arteria carotis communis dextra* sa medzi najkranialnejším podväzom a výstenným katétra prestrihne. Obvyklým spôsobom sa odstrihnú voľné konce na zostávajúcich dvoch podväzoch. Katéter sa prepláchne 1,0 ml heparínu vo fyziologickom roztoku (400 m. j.). Injekčnou striekačkou sa odsaje zbytok roztoku medzi zatvoreným peňom a proximálnym koncom katétra. Proximálny koniec katétra sa zohreje nad plameňom horiacej zápalky alebo liehového kahana a stlačením medzi dvoma prstami zataví.

O tom, že katéter je správne zavedený, svedčí viditeľná pulzácia stĺpca fyziologického roztoku s heparínom, ktorá je súhlasná so systolou srdca. Katéter sa prevlečie cez otvor v koži, ktorý je paratracheálne vpravo 0,5—1,0 cm vedľa kranialného konca operačného rezu. Prerezané krčné svaly a fascie sa zošijú

pokračovacím stehom, koža jednotlivými stehmi. Pri zošívání kože sa králik obyčajne prebúda z narkózy. Aby bol katéter krytý a fixovaný, králik sa oblečie do kabátika, ktorý má tvar vesty. Na pravej vnútornej strane vesty sa uzlovo preložený katéter v mieste svojho prekríženia prifixuje jedným stehom. Na chrbáte sa obidve strany vesty zošijú tak, aby nebránili králikovi pri dýchaní. Králiky vestu veľmi dobre znášajú a nehrozí nebezpečenie, že by si katéter vytiahli alebo prehryzli. Po zacvičení operácia trvá 10–15 minút. Na druhý deň sa rozstrihne napred steh na pravej strane vesty, ktorý fixuje katéter, potom zostávajúce tri až štyri na chrbáte a vesta sa králikovi vyzlečie. Vo väčšine prípadov roztok v katétre ešte na druhý deň pulzuje a po prepichnutí katétra injekčnou ihlou č. 30 krv samovoľne vyteká.

V prípade, kedy krv katétrom nezačne samovoľne vytekať po jeho prepichnutí, odsaje sa injekčnou striekačkou. Niekedy sa podarí odsáť, alebo pri samovoľnom vytekaní krvi je jej prúdom vytlačený k hrotu ihly trombus, v takomto prípade treba ihlu prepláchnuť a prepichnúť do katétra za trombus. Keď vytečie dostatočné množstvo krvi na suchú Petriho misku alebo hodinové skličko, vezme sa ďalšie suché hodinové skličko, na ktoré sa ponechá odtiecť 0,3–0,5 ml krvi, z ktorej sa odoberie pipetou potrebné množstvo vzorky na vyšetrenie. Vytečenie dostatočného množstva krvi znamená, že už nevyteká krv, ktorá je zriedená fyziologickým roztokom s heparínom. To sa pozná podľa toho, že vytekajúca nezriedená krv vytvára na svojom povrchu guľôčky podobne ako u ortuti. Po dobratí vzorky krvi sa katéter prepláchne 0,5 ml heparínu vo fyziologickom roztoku a pred hrotom zavedenej injekčnej ihly sa jeho lumen zavrie zatvorením peánu. Peán sa fixuje pomocou obväzu umiestneného okolo hrudníka, tak aby vyčnievajúca časť katétra po jeho stlačení zatvoreným peánom nebola príliš voľná, t. j. aby králik katéter nemohol prehryznúť.

Odbery možno robiť opakovane v potrebných časových intervaloch. Najčastejšie sme odoberali vždy vzorky krvi na druhý deň po operácii. Iba raz na troch králikoch sme skúsili odbery každý deň počas jedného týždňa, pri čom sme museli katéter každodenne preplakovať vyššie uvedeným spôsobom. K odberom vzoriek krvi možno pristúpiť ihneď po zavedení katétra; v tomto prípade treba počítať s tým, že výsledky budú ovplyvnené narkózou a operačným zákrokom. Takto zavedený katéter sa nám tiež veľmi dobre osvedčil na vykrvacanie imunizovaných králikov.

Došlo dne 11. 2. 1971

ПРИБЫШ Р. (Медицинский факультет КУ, Градец Кралове, Чехословакия). Введение катетра в *arteria carotis communis dextra* кролика. Vet. Med. (Praha) 17 (4): 249-252 1972.

В работе дается подробное описание введения полиэтиленового катетера в *arteria carotis communis dextra* кроликов и последующего взятия образцов крови через введенный катетер.

катетризация; *a. carotis communis*; кролик

PRÍBYŠ R. (Faculty of Medicine, Charles' University, Hradec Králové, Czechoslovakia). *Introduction of Polyethylene Catheter in the Right Common Carotid Artery in the Rabbit*. Vet. Med. (Praha) 17 (4): 249-252, 1972.

The paper presents a detailed description of the introduction of a polyethylene catheter in the right common carotid artery in the rabbit, and the subsequent collecting of blood samples by means of the introduced catheter.

catheterization; common carotid artery; rabbit

PRÍBIS R. (Medizinische Fakultät der Karlsuniversität, Hradec Králové, Tschechoslowakei). *Einführung des Katheters in Arteria carotis communis dextra beim Kaninchen*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 249-252, 1972.

Die Arbeit beschreibt ausführlich die Einführung eines Polyäthylenkatheters in *Arteria carotis communis dextra* bei den Kaninchen und die nachfolgende Probenentnahme mittels des eingeführten Katheters.

Katheterisation; *A. carotis communis*; Kaninchen

Adresa autora:

MUDr. R. Příbyš, CSc., Lékařská fakulta KU, katedra patologické fyziologie, Hradec Králové

SPOTREBA KRMIVA U MYŠÍ PO APLIKÁCIÍ AUROTHIOGLUKÓZY

D. Šimková, K. Boďa

Vysoká škola veterinárska, ústav patologickej fyziológie, Košice

ŠIMKOVÁ D., BOĎA K. *Spotreba krmiva u myši po aplikácii aurothioglukózy*. Vet. Med. (Praha) 17 (4) : 253-256, 1972.

Aurothioglukóza má za následok štatisticky významné zvýšenie celkovej spotreby krmiva ($P < 0,01$) u pokusných zvierat s následne vyššou váhou na konci pokusu a so štatisticky významne vyšším ($P < 0,001$) percentom celkového tuku u pokusných zvierat v porovnaní s kontrolnými. Korelácia medzi spotrebou krmiva a váhou zvierat na konci pokusu je štatisticky významná ($P < 0,01$). Niektoré zvieratá, ktorým bola aplikovaná aurothioglukóza, majú však v porovnaní s kontrolami vyššiu váhu na konci pokusu, pričom ich spotreba krmiva je podobná spotrebe krmiva u kontrol a opačne pomerne vysoká spotreba krmiva u niektorých zvierat nemá za následok zmeny na váhe.

aurothioglukóza; obezita; spotreba krmiva

Hypotalamickú obezitu označil Brobeck a kol. (1943) za následok hyperfagie. Brooks a kol. (1946) však na základe svojich experimentov uvádza, že niektoré krysy s hypotalamickými léziami môžu sa stať obézne aj bez hyperfagie. Van Putten a kol. (1955) zistil u svojich krys s hypotalamickými léziami signifikantne väčšie množstvo telového tuku v porovnaní s kontrolami, hoci podával to isté množstvo krmiva pokusným i kontrolným zvieratám.

Úkolom našej práce bolo sledovať spotrebu krmiva u dospelých myši po aplikácii aurothioglukózy, ktorá — ako je známe — vyvoláva u myši obezitu (Brecher a Waxler 1949) a spôsobuje lézie hypothalamickej oblasti (Šimková a kol. 1967).

MATERIÁL A METÓDY

V pokuse bolo desať dospelých myši — samíc, ktorým bola aplikovaná aurothioglukóza v dávke 1 mg/g ž. v. i. p. a osem kontrolných myši toho istého veku a pohlavia. Zvieratá boli umiestnené oddelene po jednom a kŕmené *ad libitum* Larsenovou diétou. Každodennú spotrebu krmiva sme sledovali pri všetkých zvieratách po dobu troch mesiacov. U zvierat po zabití bol stanovený celkový tuk metódou podľa Soxhleta. Výsledky boli štatisticky vyhodnotené.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Obrázok 1 nám ilustruje celkovú spotrebu krmiva v gramoch vo vzťahu k váhe zvierat na konci pokusu a vo vzťahu k celkovému množstvu tuku v percente zo sušiny.

Na tab. I je číselne vyjadrená celková a priemerná denná spotreba krmiva za 91 deň pokusu u každej jednotlivéj myši, váha každej myši na konci experimentu a percento zo sušiny pokusných a kontrolných zvierat.

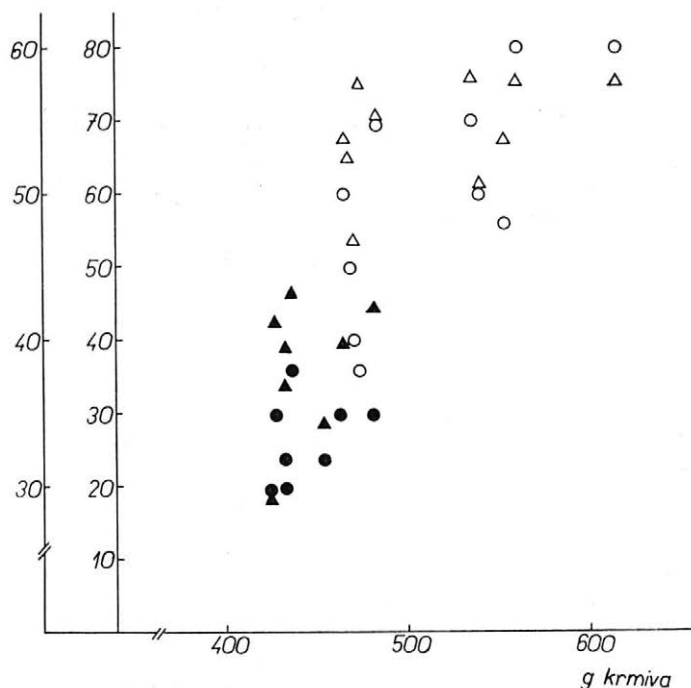
I. Dospelé myši po aplikácii aurothioglukózy

Číslo myši	Spotreba krmiva v g		Váha zvierat na konci pokusu v g	Tuk v % zo sušiny
	za 91 deň	za deň		
Pokusné				
1	484,6	5,32	55	69,7
3	466,7	5,12	50	67,1
4	561,7	6,17	60	75,5
5	553,3	6,28	60	67,2
6	614,3	6,98	55	74,6
8	536,5	5,96	50	75,8
9	469,3	5,15	48	65,2
10	540,4	5,93	45	60,7
11	472,3	5,18	40	53,3
12	474,6	5,21	38	74,7
Kontroly				
1	437,3	4,80	38	46,4
2	435,7	4,78	30	34,3
3	482,6	5,30	35	44,1
4	455,2	5,00	32	28,5
5	429,9	4,72	35	42,6
6	437,8	4,81	32	38,8
7	464,8	5,10	35	39,0
8	427,5	4,69	30	19,5

Z tab. I vidíme, že u väčšiny pokusných zvierat sa priemerná denná spotreba krmiva pohybuje od 5,12 do 6,98 g; u kontrolných myši od 4,69 do 5,30 g. U väčšiny kontrolných zvierat je priemerná denná spotreba krmiva nižšia ako u pokusných zvierat.

Keď porovnávame priemernú dennú spotrebu s konečnou váhou myši, vidíme, že vo väčšine prípadov bola vyššia denná spotreba krmiva u tých zvierat, ktoré dosiahli v porovnaní s kontrolnými i vyššiu konečnú váhu. Koreláciou konečnej váhy zvierat a celkovej spotreby krmiva ($r = +0,760 \pm 0,069$) sme zistili, že tento vzťah je štatisticky významný ($P < 0,001$). Celková spotreba krmiva pokusných zvierat za celé obdobie pokusu sa pohybovala v medziach 469,3 až 561,7 g, v priemere 517,3 g; u kontrolných zvierat 427,5 až 482,5 g, v priemere 446,3 g. Rozdiel sa ukázal štatisticky významný ($P < 0,01$). Vysoká smerodajná odchýlka u pokusných zvierat ($\pm 49,6410$) v porovnaní s kontrolami ($\pm 19,3649$) je vysvetliteľná tým, že z 10 pokusných myši, ktorým bola aplikovaná aurothioglukóza, u piatich (č. 1, 3, 9, 11 a 12) bola celková spotreba krmiva (466–484 g) podobná spotrebe u niektorých zvierat kontrolných (č. 3 a 7). U troch z týchto zvierat sa táto nízka celková spotreba krmiva zvýraznila i nižšou váhou na konci pokusu (č. 9, 11 a 12). U myši č. 10 vidíme vyššiu spotrebu krmiva (540 g), avšak jej váha na konci pokusu bola len 45 g. Naopak myši č. 1 a 3 s nízkou spotrebou krmiva dosahovali na konci pokusu váhu

g váhy % tuku



1. Celková spotreba krmiva vo vzťahu k váhe zvierat na konci pokusu a k celkovému množstvu tuku
g krmiva — celkové množstvo krmiva, spotrebovaná za 91 deň pokusu u jednotlivých myší
g váhy — váha pokusných a kontrolných myší na konci pokusu
% tuku — celkové množstvo tuku u jednotlivých myší na konci pokusu
prázdne krúžky — váha myší po aplikácii aurothioglukózy
plné krúžky — váha kontrolných myší
prázdne trojúholníčky — celkové množstvo tuku u myší po aplikácii aurothioglukózy
plné trojúholníčky — celkové množstvo tuku u kontrolných myší

55 a 50 g, teda váhu, na základe ktorej sme zvieratá označovali za obézne (Šimková, Boďa — v tlači). Pri stanovení celkového tuku sme zistili štatisticky významné ($P < 0,001$), vyššie množstvo celkového tuku zo sušiny pokusných myší v porovnaní s kontrolami. Kým u pokusných sa pohybovalo celkové množstvo tuku od 53 do 75 % zo sušiny, u kontrolných myší to boli hodnoty 19 až 46 %.

Han (1965) opisuje u svojich mladých krýs s hypotalamickými léziami rovnakú spotrebu krmiva u pokusných i kontrolných krýs, hoci na konci pokusu zistil vyššie percento celkového tuku u pokusných zvierat v porovnaní s kontrolami. Podobne sme zistili i my v týchto a v predchádzajúcich pokusoch (Šimková, Boďa — v tlači), že i zvieratá s nízkou konečnou váhou môžu obsahovať vyššie percento celkového tuku ako zvieratá kontrolné. Výsledky tejto práce hovoria zhodne s výsledkami Brooks a kol. (1946), že niektoré zvieratá po aplikácii aurothioglukózy sa môžu stať obézne aj bez hyperfágie, že u niektorých myší nie je priama úmera medzi spotrebou krmiva a váhou na konci pokusu. Porovnávajúc celú skupinu pokusných zvierat so zvieratmi kontrolnými, zisťujeme však po aplikácii aurothioglukózy vyššiu spotrebu krmiva u pokusných zvierat, u väčšiny z nich i vyššiu váhu na konci pokusu a u všetkých vyššie percento celkového tuku zo sušiny.

Zdá sa, že hyperfágia po aplikácii aurothioglukózy je dôležitým, ale nie jediným faktorom pre vznik obezity, ako je to vidieť z týchto i z predchádzajúcich výsledkov (Šimková, Boďa — v tlači).

Literatúra

BRECHER G., WAXLER S., 1949, Obesity in albino mice due to single injection of goldthioglucose. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70 : 498-501.

- BROBECK J. R., TREPPERMAN J., LONG C. N. H., 1943, Experimental hypothalamic hyperphagia in the albino rat. *Yale J. Biol. Med.* 15.: 831-853.
- BROOKS CH. McC., LOCKWOOD R. A., WIGGINS M. L., 1964, A study of the effect of hypothalamic lesion on the eating habits of the albino rats. *Am. J. Physiol.* 147: 735-741.
- 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.
- 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., Váhové prírastky dospelých a mladých myší po aplikácii aurothioglukózy. *Folia vet. (v tlači)*.
- ŠIMKOVÁ D., ŠKARDA R., BOĎA K., 1967, Patohistologické afekcie hypotalamického ventromediálneho jadra a širšieho okolia po aplikácii aurothioglukózy u myší. *Vet. Med. (Praha)* 12: 557-560.

Došlo dne 23. 4. 1971

ШИМКОВА Д., БОДЯ К. (Ветеринарный институт, Кошице, Чехословакия). Кормопотребление у мышей после введения аурутиоглюкозы. *Vet. Med. (Praha)* 17 (4): 253-256, 1972.

Аурутиоглюкоза вызывает статистически значительное увеличение общего кормопотребления ($P < 0,01$) у подопытных животных, приводящее к росту живого веса в конце опыта и к статистически значительному росту ($P < 0,001$) % общего жира по сравнению с контрольными животными. Корреляция между кормопотреблением и весом в конце опыта статистически значима ($P < 0,01$). Но некоторые потребившие аурутиоглюкозу животные в конце опыта весят больше контрольных, хотя их кормопотребление одинаково, и, наоборот, сравнительно большое кормопотребление у некоторых животных вовсе не вызывает изменений веса.

аурутиоглюкоза; ожирение; кормопотребление

ŠIMKOVÁ D., BOĎA K. (University of Veterinary Medicine, Košice, Czechoslovakia). *Feed Consumption in Mice after Application of Aurothioglucoze*. *Vet. Med. (Praha)* 17 (4): 253-256, 1972.

Aurothioglucoze results in a statistically significant increase of the total feed consumption ($P < 0,01$) in experimental animals with a following higher weight at the end of the experiment and a significantly higher ($P < 0,001$) percentage of fat in experimental animals compared to control animals. The correlation between the feed consumption and the weight of animals at the end of the experiment is statistically significant ($P < 0,01$). But some animals to which aurothioglucoze has been applied have a higher weight at the end of the experiment compared to the control while their feed consumption is similar to that of the control, and on the contrary a relatively high feed consumption in some animals does not result in changes of weight.

aurothioglucoze; obesity; feed consumption

ŠIMKOVÁ D., BOĎA K. (Hochschule für Veterinärmedizin, Košice, Tschechoslowakei). *Futtermittelverbrauch nach Applikation der Aurothioglukose bei Mäusen*. *Vet. Med. (Praha)* 17 (4): 253-256, 1972.

Die Aurothioglukose hat bei Versuchstieren eine statistisch bedeutende Erhöhung des gesamten Futtermittelverbrauchs ($P < 0,01$) und ein erhöhtes Gewicht am Versuchsende mit — im Vergleich zu den Kontrolltieren — einem statistisch bedeutend höheren Prozentsatz des gesamten Fettes ($P < 0,001$) zur Folge. Die Korrelation zwischen dem Futtermittelverbrauch und dem Gewicht am Ende des Versuchs ist statistisch signifikant ($P < 0,01$). Einige Tiere, denen die Aurothioglukose appliziert wurde, haben im Vergleich zu den Kontrolltieren höheres Gewicht am Versuchsende, wobei ihr Futtermittelverbrauch jedoch ähnlich wie bei Kontrolltieren ist, und im Gegenteil, ein relativ hoher Futtermittelverbrauch bei anderen Tieren hat keine Gewichtsänderungen zur Folge.

Aurothioglukose; Obesität; Futtermittelverbrauch

Adresa autorů:

MVDr. D. Šimková, CSc., prof. MVDr. K. Boďa, DrSc.,
Vysoká škola veterinárská, Košice

OBSAH

Zuffa A., Salaj J.: Imunizácia proti Aujeszského chorobe — imunogenita avirulentného klónu Buk-TK-300/9,2 pre hovädzí dobytok	201
Dvořák M.: Účinek ACTH na koncentraci kyseliny askorbové v nadledvinách a v játrech během vývoje selat	211
Schvarc F.: Histologické a histochemické zmeny v endometriu kráv pri niektorých ovariálnych poruchách	217
Prokúpek K.: Letální šok vyvolaný živou kulturou <i>Bacillus cereus</i>	225
Čupera Z.: Protilátková odpověď zvířat na aplikaci vakcín proti vzteklině	233
Šamo A., Bartík M.: Heterogenita arylamidáz štiepiacich L-leucyl-p-nitroanilid v krvných sérach hospodárskych zvierat	243
Príbyš R.: Zavedenie katétra do <i>arteria carotis communis dextra</i> u kráľíka	249
Šimková D., Boďa K.: Spotreba krmiva u myši po aplikácii aurothioglukózy	253

СОДЕРЖАНИЕ

Жуффа А., Салай Й.: Иммунизация против болезни Ауйесзки — иммуногенность авирулентного штамма Бук-ТК 300/9,2 для крупного рогатого скота	209
Дворжак М.: Действие АСТН на концентрацию аскорбиновой кислоты в надпочечниках и печени в период развития поросят	215
Шварц Ф.: Гистологические и гистохимические изменения в эндометрии коров при некоторых овариальных нарушениях	223
Прокуpek K.: Летальный шок, вызванный живой культурой <i>Bacillus cereus</i>	231
Чупера З.: Антителовая реакция животных на применение вакцины против бешенства	241
Шамо А., Бартик М.: Гетерогенность ариламидаз, расщепляющих Л-лейцил-п-нитроанилид в кровяных сыворотках сельскохозяйственных животных	247
Прибыш Р.: Введение катетра в <i>arteria carotis communis dextra</i> кролика	251
Шимкова Д., Бодя К.: Кормопотребление у мышей после введения аурутиоглюкозы	256

CONTENT

Zuffa A., Salaj J.: Immunization against Aujeszký's Disease — Immunogenicity of the Avirulent Clone Buk-TK-300/9,2 for Cattle	210
Dvořák M.: Effect of ACTH on Ascorbic Acid Concentration in Suprarenal Glands and Liver during Piglet Development	215
Schvarc F.: Histological and Histochemical Changes in the Endometrium of Cows in Some Ovarial Lesions	223
Prokúpek K.: The Lethal Shock Caused by a Live Culture of <i>Bacillus cereus</i>	232
Čupera Z.: The Antibody Response of Animals to the Application of the Antirabic Vaccine	242
Šamo A., Bartík M.: The Heterogeneity of Arylamidases Cleaving L-leucyl-p-nitroanilide in the Blood Serum of Farm Animals	248
Príbyš R.: Introduction of Polyethylene Catheter in the Right Common Carotid Artery in the Rabbit	251
Šimková D., Boďa K.: Feed Consumption in Mice after Application of Aurothioglucose	256

INHALT

Zuffa A., Salaj J.: Immunisierung gegen Aujeszkysche Krankheit — Immunogenität des avirulenten Klons Buk-TK-300/9,2, für Rindvieh	210
Dvořák M.: Effekt des ACTH auf die Askorbinsäurekonzentration in der Nebenniere und der Leber im Verlaufe der Ferkelentwicklung	216
Schvarc F.: Histologische und histochemische Änderungen im Kuhendo-	

metrium bei einigen Ovarialstörungen	224
Prokúpek K.: Letaler Schock ausgelöst von einer lebendigen Kultur des <i>Bacillus cereus</i>	232
Čupera Z.: Antikörperantwort der Tiere auf Applikation von Vakzinen gegen Tollwut	242
Šamo A., Bartík M.: Heterogenität der das L-Leucyl-p-Nitroanilid in Blutseren der landwirtschaftlichen Nutztiere spaltenden Arylamidasen	248
Príbyš R.: Einführung des Katheters in <i>Arteria carotis communis dextra</i> beim Kaninchen	252
Šimková D., Boďa K.: Futtermittelverbrauch nach Applikation der Aurothioglucose bei Mäusen	256

TABLE DES MATIÈRES

Zuffa A., Salaj J.: Immunisation contre la maladie d'Aujeszky — immunogénité du clone avirulent Buk-TK-300/9,2 pour le cheptel bovin (res. An, Al/210).	
Dvořák M.: Effet de ACTH sur la concentration de l'acide ascorbique dans les surrénales et le foie au cours de l'évolution des porcelets (res. An/215, Al/216).	
Schvarc F.: Altérations histologiques et histochimiques dans l'endomètre des vaches qui accompagnent certains troubles ovariens (res. An/223, Al/224).	
Prokúpek K.: Choc léthal provoqué par la culture vivante de <i>Bacillus cereus</i> (res. An, Al/232).	
Čupera Z.: Réplication des anticorps des animaux à l'application du vaccin contre la rage (res. An, Al/242).	
Šamo A., Bartík M.: Hétérogénéité des arylamidases provoquant la scission de la L-Leucyl-p-nitroanilide dans les sérums sanguins des animaux de ferme (res. An, Al/248).	
Príbyš R.: Introduction du cathéter dans <i>arteria carotis communis dextra</i> du lapin (res. An/251, Al/252).	
Šimková D., Boďa K.: Consommation des aliments par les souris à la suite de l'application de l'aurothioglucose (res. An, Al/256).	