

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

5

ROČNÍK 18 (XLVI)
PRAHA
KVĚTEN 1973
CENA 10 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Rídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král (předseda), prof. MVDr. Kolo-
man Boďa, DrSc., doc. MVDr. Jan Carvaš, 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, CSc.,
MVDr. Andrej Mačička, CSc., doc. MVDr. Ladislav Polák,
CSc., MVDr. Jiří Srna, prof. MVDr. Jaroslav Vrtiak, DrSc.
Vedoucí redaktorka ing. Jovanka Václavíčková

© Ústav vědeckotechnických informací, Praha 1973

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje stu-
die, rozbor a vědecká pojednání o vyřešených úkolech vý-
zkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav vědecko-
technických informací. Vychází měsíčně. Redakce: 120 56
Praha 2, Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné
Kčs 120,—.

Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзор-
ы, анализы и научные статьи о разрешенных задачах по науч-
ному исследованию в области ветеринарии. Издает Институт
научно-технической информации. Выход в свет ежемесячно.
Редакция 120 56 Прага 2, Слезска 7.

The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publishes
studies, analyses and scientific treatises about the solved
research tasks in the line of the veterinary medicine. Pu-
blished by the Institute of Scientific and Technical Inform-
ation. Issued monthly. Editorial office 120 56 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 120 56 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 Informations Scienti-
fiques et Techniques. Paraît une fois par mois. Rédaction
120 56 Prague 2, Slezská 7.

VLIV FORMALINU A BETAPROPIOLAKTONU NA INFEKČNOST A ANTIGENICITU PŮVODCE VIROVÉ GASTROENTERITIDY PRASAT (VGP)

J. Štěpánek, J. Menšík, Z. Pospíšil, V. Rozkošný

Výzkumný ústav veterinárního lékařství ČAZ, Brno

ŠTĚPÁNEK J., MENŠÍK J., POSPÍŠIL Z., ROZKOŠNÝ V. *Vliv formalinu a betapropiolaktону na infekčnost a antigenicitu původce virové gastroenteritidy prasat (VGP)*. Vet. Med. (Praha) 18 (5) : 269—280, 1973.

Virus VGP je citlivý k působení formalinu a betapropiolaktону (BPL) a je těmito látkami spolehlivě inaktivován. Formalin je účinný ještě v 0,01% koncentraci. Jeho působením při 37 °C ztrácí virus svou cytopatogenní aktivitu již za 150 minut. Při 4 °C je proces inaktivace pomalejší, takže virus je ještě po 24 hodinách pro tkáňové kultury infekční, i když se jeho titr podstatně snižuje. Limitní koncentrace betapropiolaktónu, dostačující k plné aktivaci viru VGP, je 0,05 %. Po působení BPL ztrácí virus nejen svou schopnost pomnožovat se na tkáňových kulturách, ale je zcela neinfekční i pro novorozená selata. Při 37 °C je inaktivace viru 0,05 % BPL úplná za 20 minut, zatímco při 4 °C musí BPL působit alespoň 16 hodin. Účinek vyšších ředění formalinu (0,005 %—0,001 %) a BPL (0,01 % až 0,001 %) se projevuje pouze snížením titru. Virus inaktivovaný limitujícími koncentracemi formalinu a BPL si zachovává svou imunogenní aktivitu a po intramuskulární aplikaci indukuje u prasat tvorbou protilátek. Nejvyšší hladiny protilátek byly zaznamenány po opakované aplikaci viru inaktivovaného 0,05 % betapropiolaktónem při 4 °C.

virová gastroenteritida prasat; inaktivace; formalin; betapropiolaktón; antigenicita

Prevence virové gastroenteritidy a snížení ztrát, které tato nákaza v chovech prasat způsobuje, není stále ještě jednoznačně vyřešeným problémem. Léčba selat sérem (Saunders 1964) nebo citrátovou krví rekonvalescentních prasat (Noble 1964) není dostatečně účinná a v praxi se neosvědčila (Olson 1969, Menšík a kol. 1970, Jackson 1971).

Nejrozšířenější metodou používanou v USA k omezení ztrát sajících selat je zkrmování plně infekčního materiálu z nemocných zvířat březím prasnicím (Haelterman a Hutchings 1956, Bay a kol. 1953, Olson 1969). Tento postup je založen na praktických poznatcích, že kolostrum a mléko prasnic, které prodělaly onemocnění více než 14 až 21 den před porodem, chrání jejich selata před infekcí (Bay a kol. 1953, Haelterman a Hutchings 1956, Lee a kol. 1954, Saunders 1964, Hooper a Haelterman 1966, Derbyshire a kol. 1969). Ani tato praxe není však vždy úspěšná a navíc může vést k rozšíření jiných infekcí nebo k nepřetržitému pasážování plně infekčního viru VGP v chovu (Kolveit 1970).

Při inaktivaci teplem, éterem, chloroformem a teplem za spoluúčasti magneziových kationtů ztrácí virus nejen svoji infekčnost, ale i schopnost vyvolat u prasat tvorbu protilátek a je proto k vakcinaci nepoužitelný (McClurkin a Norman 1966). Z tohoto důvodu neměla ani

inaktivovaná vakcína, vyvinutá v USA (Welter 1965), dostatečný imunizační efekt (Kolvet 1970).

V posledních letech byla k inaktivaci virových agens použita řada látek, které při spolehlivém inaktivačním účinku nerozrušují antigenní strukturu infekčních zárodků a nejsou pro člověka a zvířata toxické.

V práci jsme sledovali dynamiku inaktivace viru VGP působením betapropioloktonu (dále jen BPL) a formalinu a srovnávali imunogenní aktivitu takto inaktivovaného viru s virem živým.

MATERIÁL A METODY

VIRUS

K pokusům byla použita 17. pasáž kmene M42 viru VGP izolovaného v ČSSR a pasážovaného na tkáňových kulturách primárních prasečích ledvin (VL).

TKÁŇOVÉ KULTURY

Tkáňové kultury primárních prasečích ledvin byly připravovány a udržovány podle běžných laboratorních metodik (Dulbecco a Vogt 1954). Při trypsinaci a kultivaci buněk z tyreoidních žláz prasat byl tento metodický postup modifikován podle Witta a Easterdaye (1967).

STANOVENÍ CITLIVOSTI VIRU K PŮSOBNÍ FORMALINU

Formalin (36–38%) byl naředěn ve sterilním fosfátovém pufru pH 7,2 na 1%, 0,1% a 0,01% roztok. Tyto zásobní roztoky formalinu byly přidávány k viru tak, aby byla dosažena žádaná konečná koncentrace formalinu (tab. I.). Směs viru a formalinu byla ponechána při

I. Inaktivace viru VGP různými koncentracemi formalinu při teplotě 37 °C a 4 °C

Použitý virus: M-42/19. VL; výchozí titr 10–6,5

Konečná koncentrace formalinu ve viru v %	Titr viru (log TKID ₅₀ /0,1 ml)	
	po 3 hod. působení formalinu při 37 °C	po 24 hod. působení formalinu při – 4 °C
0,200	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,100	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,050	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,040	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,030	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,020	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,010	úplná inaktivace	0,50
0,005	1,24	2,24
0,001	4,24	4,70

4 °C po dobu 24 hodin a při 37 °C ve vodní lázni po dobu tří hodin. Stupeň inaktivace viru byl určen titrací na tkáňových kulturách.

Pro stanovení inaktivační křivky byla použita 0,01% koncentrace formalinu, tj. jeho nejvyšší ředění spolehlivě inaktivující virus. Virus byl rozplněn do zkumavek po 0,9 ml a po přidání 0,1 ml 0,1% roztoku formalinu (ve fosfátovém pufru pH 7,2) byl spolu s virem kontrolním uložen při 37 °C a 4 °C a v předem stanovených časových intervalech odebrán k titraci.

STANOVENÍ CITLIVOSTI VIRU K PŮSOBNÍ BETAPROPIOLAKTONU

Betapropiolakton (BPL) byl naředěn fosfátovým puftrem (pH 7,2) na 10%, 1%, 0,1% a 0,01% roztok tak, aby byla dosažena žádaná konečná koncentrace BPL (tab. II).

II. Inaktivace viru VGP různými koncentracemi betapropiolaktonu (BPL) při teplotě 37 °C a 4 °C

Použitý virus: M-42/17-VL; výchozí titr: 10^{-5,5}

Konečná koncentrace BPL ve viru v %	Titr viru (log TKID ₅₀ /0,1 ml)	
	po 1 hod. působení při 37 °C	po 24 hod. působení při 4 °C
1,000	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,800	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,600	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,400	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,200	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,150	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,100	úplná inaktivace	úplná inaktivace
0,050	* úplná inaktivace	* úplná inaktivace
0,010	* úplná inaktivace **	* 0,24 **
0,005	* 0,24 **	1,70
0,001	2,50	4,70

* = tkáňové kultury v těchto zkumavkách (bez CPE) byly zmrazeny a testovány na infekčnost na další šarži tkáňových kultur

** = cytopatický efekt se objevil v první další pasáži

Směsi viru s BPL byly inkubovány jednak jednu hodinu při 37 °C, jednak 24 hodiny při 4 °C. Reziduální infekčnost jednotlivých vzorků byla stanovena titračně v tkáňových kulturách.

Pro stanovení časového průběhu inaktivace viru byla použita 0,05% koncentrace BLP. K viru rozplněnému do zkumavek po 1,9 ml předehřátému na 37 °C nebo naopak ochlazenému na 4 °C byl přidán 1% roztok BPL v množství 0,1 ml. Ihned po protřepání byla směs spolu s kontrolními vzorky viru inkubována ve vodní lázni při 37 °C nebo v ledniče při 4 °C. Vzorky viru, odebrané v různých časových intervalech,

byly okamžitě hluboko zmrazeny na -40°C a při této teplotě udržovány až do titrace.

TITRACE VIRU

Virus ošetřený BPL byl ředěn ve vodní lázni při 0°C v Earlově médiu vychlazeném na tutéž teplotu. Směsi viru s formalinem a virus kontrolní byly ředěny při pokojové teplotě. Každé ředění viru bylo v množství 0,1 ml inokulováno na tři zkumavky s kompletně narostlými monolayery primárních prasečích ledvinových buněk. Po jednohodinové adsorbci při 37°C byly tkáňové kultury propláchnuty pufovaným fyziologickým roztokem a po přidání udržovacího media kultivovány v termostatu. Výsledek byl definitivně hodnocen podle rozvoje cytopatického efektu šestý den po infekci a titr viru byl stanoven výpočtem podle Reeda a Muenche (1938).

STANOVENÍ INFEKČNOSTI VIRU VGP INAKTIVOVANÉHO BPL PRO SELATA

Stupeň inaktivace viru VGP po 18hodinovém působení 0,05% beta-propiolaktonu při 4°C byl testován na bezkolostránních selatech získaných hysterektomií, chovaných za sterilních podmínek v izolačních boxech. Šesti selatům byl od druhého do desátého dne stáří podáván denně inaktivovaný virus v dávce 5 ml *per os*. Zbývající dvě selata, držaná v jiném izolačním boxu, byla druhý den po vybavení perorálně infikována 5 ml živého viru. U všech selat byla sledována klinická reakce, především výskyt zvracení a průjmu.

STANOVENÍ IMUNOGENNÍ AKTIVITY INAKTIVOVANÉHO VIRU

Virus inaktivovaný 0,05% BPL (24 hodiny při 4°C) nebo 0,01% formalinem (3 hodiny při 37°C) a původní virus živý byl smíchán v poměru 2 : 1 s olejovým adjuvans (15 ml parafinového oleje, 5 g lanolinu a 1 ml Tweenu 80) a aplikován v dávce 10 ml intramuskulárně běhounům 35 až 40 kg těžkým buď jedenkrát nebo dvakrát v intervalu tří týdnů. Kontrolním běhounům ustájeným společně se zvířaty imunizovanými inaktivovaným virem bylo podáno pouze medium z neinfikovaných tkáňových kultur, smísené s adjuvans. Běhouni, kterým byl aplikován živý virus, byli spolu s dalšími kontrolami ustájeni samostatně v přísné izolaci od ostatních. Protilátková odpověď byla zjišťována stanovením virusneutralizačních protilátek v krevních sérech odebíraných za různou dobu po aplikaci viru.

VIRUSNEUTRALIZAČNÍ TEST

Pro virusneutralizační test byly použity sekundární nebo terciární tyreoidní buňky dospělých prasat. Směs viru a séra byla v množství 0,2 ml inokulována do 0,8 ml suspenze tyreoidních buněk (200 000 buněk v 1 ml) v jamkách ploten z umělé hmoty. Plotny byly inkubovány při 37°C v prostředí obsahujícím 5 % CO_2 . Titr protilátek byl hodnocen podle růstu buněk za šest dnů po nasazení.

VÝSLEDKY

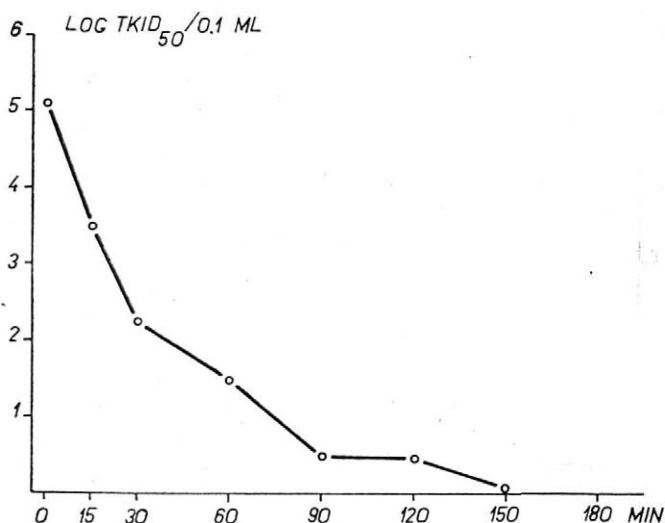
INAKTIVAČNÍ ÚČINEK RŮZNÝCH KONCENTRACÍ FORMALINU

Virus M42 o výchozím titru $10^{-6,5}$ byl působením 0,01% formalinu při 37 °C úplně inaktivován za tři hodiny. 0,005% koncentrace formalinu snižovala infekčnost viru o více než 10^5 TKID₅₀/0,1 ml a 0,001% koncentrace o více než 10^2 TKID₅₀/0,1 ml.

Při teplotě 4 °C byl účinek formalinu na infekčnost viru podstatně pomalejší. Během 24 hodin byl virus úplně inaktivován 0,02% formalinem. Po působení 0,01% koncentrace si neředěná virová suspenze uchovala schopnost vyvolat cytopatický efekt. Vyšší ředění formalinu (0,005% a 0,001%) způsobila pouze určité snížení titru (tab. I).

RYCHLOST INAKTIVACE VIRU LIMITNÍ KONCENTRACÍ FORMALINU

Limitní 0,01% koncentrací formalinu při 37 °C byl virus úplně inaktivován do 150 minut. Průběh inaktivace byl rychlý a pravidelný, takže inaktivační křivka měla téměř lineární charakter (obr. 1).



1. Inaktivace viru M-42
0,01% formalinem při 37
stupních Celsia

Při teplotě 4 °C nebyla inaktivace viru formalinem úplná a virus si zachoval i po 24 hodinách určitou, i když velmi nízkou reziduální infekčnost. Z počátku, během prvních čtyř hodin působení, byl efekt formalinu poměrně rychlý. Titr viru se během této doby snížil o více než 10^3 TKID₅₀/0,1 ml. V době od čtyř do šesti hodin se inaktivační účinek formalinu zpomalil a infekčnost viru se snížila pouze o $10^{1,0}$ TKID₅₀/0,1 ml. Stejný pokles byl zaznamenán i mezi 16. až 24. hodinou (obr. 2).

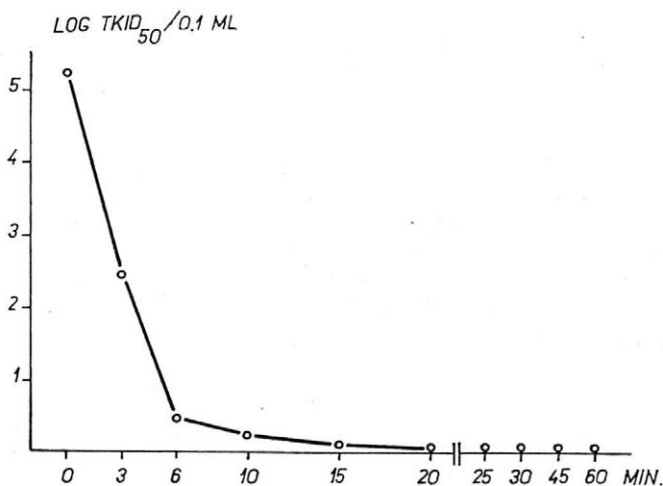
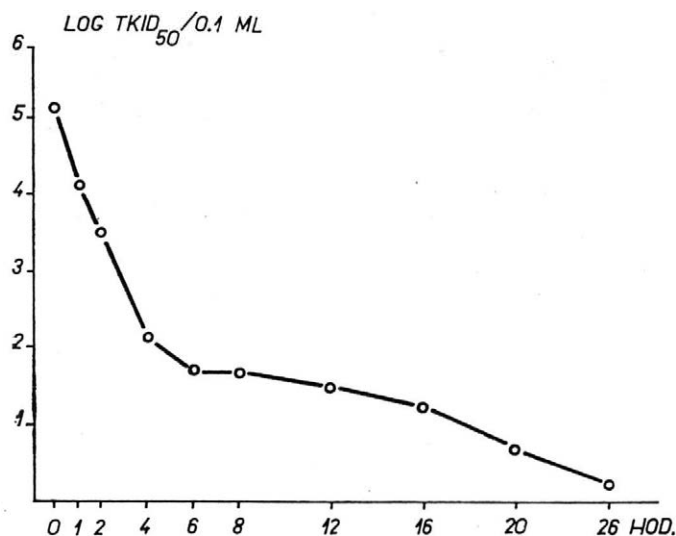
STANOVENÍ INAKTIVAČNÍHO ÚČINKU RŮZNÝCH KONCENTRACÍ BETAPROPIOLAKTONU

Virus byl zcela inaktivován jednohodinovým (při 37 °C) nebo 24hodinovým (při 4 °C) působením 0,05%—1% BPL (tab. II). 0,01% a 0,005%

koncentrací BPL při 37 °C byl virus inaktivován tak, že nevytvořil cytopatické změny v první pasáži. Jeho infekčnost se projevila teprve dalším pasážováním ve tkáňových kulturách. Stejný efekt byl zaznamenán i při inaktivaci BPL při 4 °C. Působením nižších koncentrací BPL docházelo pouze k částečnému snížení titru [u viru inaktivovaného 0,01% BPL při 37 °C a 10^3 TKID₅₀/0,1 ml, 0,005% BPL při 4 °C téměř o 10^4 TKID₅₀/0,1 ml a 0,001% BPL při 4 °C o necelých $10^{1,0}$ TKID₅₀/0,1 ml.

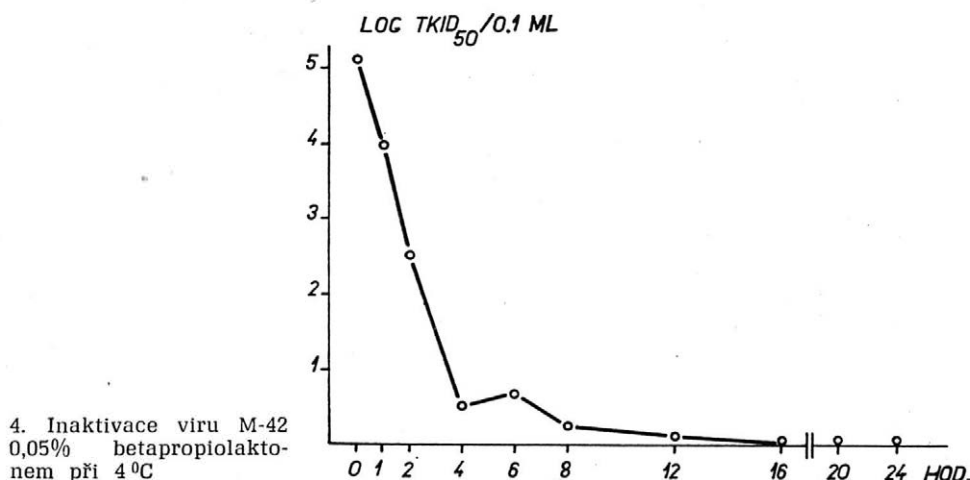
RYCHLOST INAKTIVACE VIRU LIMITNÍ KONCENTRACÍ BPL

Pro stanovení časového průběhu inaktivace viru při 37 °C a 4 °C byla použita limitní 0,05% koncentrace BPL. Při 37 °C byla inaktivace velmi rychlá a pravidelná. Inaktivační křivka měla téměř lineární cha-



rakter (obr. 3). Již během šesti minut klesl titr viru k hodnotám nižším než 10^{-1} , tj téměř o 10^5 TKID₅₀/0,1 ml. Určité reziduum živého viru se však v testovaném vzorku udržovalo až do 15. minuty. K úplné inaktivaci došlo až po 20minutovém působení 0,05% BPL.

Podobný průběh měla inaktivační křivka i při teplotě 4°C. K hodnotám menším než 10^{-1} klesl titr viru již po čtyřhodinovém působení BPL, ale virus si udržoval určitou infekčnost ještě za 12 hodin. Úplná inaktivace byla zaznamenána až po 16 hodinách působení 0,05% BPL (obr. 4).



OVĚŘENÍ NEŠKODNOSTI VIRU INAKTIVOVANÉHO BPL PRO SELATA

Virus VGP inaktivovaný 18hodinovým působením 0,05% BPL při 4°C byl pro selata zcela neinfekční. U žádného z osmi pokusných sterilních selat odchovávaných bez kolostra na umělé výživě se ani po několikrát opakované perorální aplikaci inaktivovaného viru neobjevily příznaky připomínající virovou gastroenteritidu. Také imunofluorescenční vyšetření tenkých střev na přítomnost viru VGP, provedené u dvou selat utracených čtvrtý den po poslední aplikaci viru, bylo negativní.

U dvou kontrolních selat, která byla infikována virem živým, se průměrně objevil za 36 až 48 hodin a virus byl v jejich tenkém střevě prokázán imunofluorescencí.

PRŮKAZ IMUNOGENNÍ AKTIVITY VIRU INAKTIVOVANÉHO BETAPROPIOLAKTONEM A FORMALINEM

Po *z. m.* aplikaci živého viru smíšeného v poměru 2 : 1 s imunizačním adjuvans nebyla u žádného z pokusných prasat pozorována klinická reakce, ale v jejich krevních sérech byly prokázány neutralizační protilátky, které dosáhly za 28 dnů po aplikaci průměrného titru 1 : 130 (tab. III). Během dalších 20 dnů se jejich hladina ještě zvýšila (1 : 190). U jednotlivých prasat titr kolísal od 1 : 64 do 1 : 512.

U kontrolních běhounů ustájených v kontaktu s pokusnými nebyly

III. Protilátková odpověď běhounů na intramuskulární aplikaci viru VGP inaktivovaného BPL a formalinem

Skupina	Počet zvířat	Použitý virus způsob inaktivace	Počet aplikací	Titř protilátek		
				před aplikací	28 dní po aplikaci	48 dní po aplikaci
I	5	M-42 inaktivace formalinem	1X	negativní	16, 32, 64, 64, 128 prům. titr. 1 : 60	neg., neg., 8, 32, 32 prům. titr. 1 : 14,5
II	7	M-42 inaktivace formalinem	2X	negativní	16, 64, 64, 64, 64, 128, 256 prům. titr. 1 : 94	neg., 8, 16, 16, 64, 64, 64 prům. titr. 1 : 33,0
III	7	M-42 inaktivace BPL	1X	negativní	neg. 64, 64, 64, 128, 256, 256 prům. titr. 1 : 138,6	neg., 8, 8, 8, 16, 64, 128 prům. titr. 1 : 33,0
IV	7	M-42 inaktivace BPL	2X	negativní	neg., neg., 128, 128, 128, 128, 256 prům. titr. 1 : 110	32, 32, 64, 128, 128, 128, 256 prům. titr. 1 : 110
V	3	neinfekční tkáňová kultura	2X	negativní	negativní	negativní
VI	5	M-42 živý virus	2X	negativní	64, 64, 128, 256, 128 prům. titr. 1 : 130	64, 128, 128, 256, 512 prům. titr. 1 : 190
VII	3	bez aplikace	—	negativní	negativní	negativní

pozorovány žádné klinické příznaky onemocnění ani tvorba virusneutralizačních protilátek.

Antigenní aktivitu si virus zachoval i po šetrné inaktivaci 0,05% BPL (při 4 °C 18 hodin) nebo 0,01% formalinem (při 37 °C 3 hodiny). Vyšší úroveň imunity byla zaznamenána u prasat, kterým byl aplikován virus inaktivovaný BPL. Průměrný titř protilátek, stanovený za 28 dnů po aplikaci, se u zvířat této skupiny pohyboval mezi 1 : 110 až 1 : 120, zatímco u prasat imunizovaných virem inaktivovaným formalinem dosahoval pouze hodnot 1 : 50 až 1 : 94 (tab. III). Za dalších 20 dnů došlo u běhounů, kterým byl inaktivovaný virus aplikován jednorázově a u prasat imunizovaných opakovaně virem inaktivovaným formalinem, k výraznému snížení úrovně imunity. U žádného z nich nepřesáhla hladina protilátek titř 1 : 64. Průměrný titř se pohyboval mezi 1 : 14,5 až 1 : 33. Pouze u prasat, kterým byl opakovaně podán virus inaktivovaný BPL, se hladina protilátek udržela na stejné úrovni.

V reakci jednotlivých prasat na aplikaci inaktivovaného antigenu byly zaznamenány určité individuální difference. Po podání viru inaktivovaného formalinem byla sice protilátková odpověď za 28 dní po vakcinaci zaznamenána u všech zvířat, ale titry protilátek byly značně rozdílné. Kolísaly ve velmi širokém rozmezí od 1 : 16 do 1 : 256. Na první aplikaci viru inaktivovaného BPL některá prasata nereagovala a první protilátky se u nich objevily až po opakovaném podání antigenu (tab. III).

U kontrolních zvířat ustájených po celou dobu experimentu v kontaktu s pokusnými nebyly protilátky neutralizující virus VGP vůbec prokázány (tab. III, sk. V).

DISKUSE

Formalin a betapropiolakton, které jsou často používány k inaktivaci různých virů nebo k virologické sterilizaci biologických produktů (Lo Grippo 1969), účinně ovlivňují infekčnost viru VGP.

Inaktivační efekt formalinu, který je účinný ještě v 0,01% koncentraci, je výrazně potencován spolupůsobením vyšších teplot. Na rozdíl od teploty 37 °C, při které byl virus VGP již za 150 minut pro tkáňové kultury zcela neinfekční, se interval nezbytný k jeho inaktivaci při 4 °C prodloužil na více než 24 hodiny.

Betapropiolakton ovlivňoval infekčnost viru ještě výrazněji. Limitující koncentrace, nezbytná pro spolehlivou inaktivaci viru VGP, byla 0,05 %. Podobně popisují inaktivační efekt BPL pro virus vztekliny, východní koňské encefalitidy, lymfocytární choriomeningitidy, influenzy, lidské poliomyelitidy i Lo Grippo (1959), Lo Grippo a Hartman (1955), Lo Grippo (1958), pro virus pseudomoru drůbeže (NDV) Polonyi a Vrtiak (1968), pro virus aviární ecefalomyelitidy McLeod (1965) a pro virus slintavky a kulhavky Felowes (1965).

Velmi důležitým faktorem, který aktivně spolupůsobí při inaktivaci viru VGP betapropiolaktonem a výrazně ovlivňuje její dynamiku, je teplota, při které reakce probíhá. Lze to vysvětlit tím, že inaktivační efekt spočívá v jeho postupném rozpadu (látko je stabilní pouze v koncentrovaném a purifikovaném stavu a nikoli v roztoku) na deriváty kyseliny propionové nebo hydrakrylové, který je rychlejší při vyšších teplotách (Lo Grippo 1959). Při 37 °C byl virus VGP zcela inaktivován již za 20 minut, ale při 4 °C se interval nutný k plné inaktivaci viru prodloužil na 16 hodin. Oba tyto časové termíny odpovídaly době, za kterou dochází k rozpadu přibližně 50 % aktivního BPL ředěného na 0,05% koncentraci (Lo Grippo 1959).

Virus vystavený 16hodinovému působení 0,05% betapropiolaktonu při 4 °C byl zcela neinfekční pro třídenní bezkolostrální selata získaná hysterektomií, chovaná za sterilních podmínek, u kterých se ani po opakované perorální aplikaci vysokých dávek viru neobjevily příznaky virové gastroenteritidy.

V krevních sérech prasat, kterým byl intramuskulárně aplikován živý virus, byly prokázány virusneutralizační protilátky za 28 až 48 dnů po aplikaci. Skutečnost, že u kontrolních zvířat ustájených v kontaktu s pokusnými nedošlo ke tvorbě neutralizačních protilátek, je nepřímým důkazem toho, že se virus po intramuskulární aplikaci prasatům nevylučoval do prostředí a že protilátková odpověď byla vyvolána jen parenterálním podáním viru.

Tvorbu protilátek po intramuskulární aplikaci živého viru VGP znamenali také Thorsen a Djurickovic (1970), Sheffy (1965), Lee a kol. (1954), Harada a kol. (1969).

Antigenní aktivitu si virus zachoval i po šetrné inaktivaci 0,01%

formalinem nebo 0,05% betapropiolaktonem, i když protilátková odpověď zaznamenaná po intramuskulární aplikaci inaktivovaného viru nebyla tak výrazná jako po imunizaci virem živým. Zatímco po jednorázovém podání živého viru byla odpověď 100%, reagovalo na aplikaci viru inaktivovaného betapropiolaktonem pouze 80 % běhounů. U zbývajících došlo ke tvorbě protilátek teprve po opakované aplikaci. Také výška titru a přetrvávání imunity byly po aplikaci živého viru výraznější než po podání viru inaktivovaného. Podobný efekt zaznamenali u betapropiolaktonem inaktivovaných virů i LoGrippe a Hartman (1955) a LoGrippe (1958).

Z obou způsobů inaktivace byla z hlediska tvorby protilátek výhodnější inaktivace betapropiolaktonem. U běhounů, kterým byl aplikován takto inaktivovaný virus, byla hladina protilátek signifikantně vyšší a vysoká úroveň imunity u nich přetrvávala ještě za 48 dnů po aplikaci. Průměrný titr protilátek byl u zvířat této skupiny téměř třikrát vyšší než u běhounů imunizovaných virem inaktivovaným formalinem.

Uvedené poznatky by mohly mít značný význam pro úspěšnou prevenci ztrát, které nákaza způsobuje. Dosavadní pokusy v tomto směru nebyly jednoznačně úspěšné. Imunizační efekt inaktivované vakcíny vyvinuté ve Spojených státech (Welter 1965) není podle údajů Kolveita (1970) dostatečný.

Spolehlivou chráněnost u selat odchovávaných pod prasnicemi, které byly dvakrát až třikrát před porodem imunizovány intramamární instilací (dučejem strukovým) živého viru VGP zaznamenali Thorsen a Djurickovic (1970). Schopnost vyvolat u prasnic dostatečnou imunitu a zajistit odolnost jejich selat před infekcí si virus zachoval i po inaktivaci 0,2 % BPL (Thorsen a Djurickovic 1971).

Tyto dosud ojedinělé údaje jsou v souladu s našimi výsledky, týkajícími se schopnosti viru VGP inaktivovaného BPL vyvolat u dospělých prasat tvorbu protilátek. Poznatky, že si virus VGP po inaktivaci 0,05% betapropiolaktonem zachovává svou imunogenní aktivitu a je zcela neinfekční pro novorozená selata, mohou být v budoucnu využity pro prevenci virové gastroenteritidy ve velkochovech, které jsou jejím vzplutím trvale ohroženy.

Literatura

- BAY W. W., DOYLE L. P., HUTCHINGS L. M., 1953, Transmissible gastroenteritis of swine. J. Am. vet. med. Ass. 122: 200—202.
- DERBYSHIRE J. B., JESSETT D. M., NEWMAN G., 1969, An experimental epidemiological study of porcine transmissible gastroenteritis. J. comp. Path. 79: 445—452.
- DULBECCO R., VOGT M., 1954, Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. exp. Med. 99: 167—182.
- FELLOWES O. N., 1965, Comparison of the inactivation and antigenicity of food-and-mouse disease virus by acetylenimine and by combined effect of ultraviolet light and betapropiolactone. J. Immun. 95: 1100—1106.
- HAELTERMAN E. O., HUTCHINGS L. M., 1956, Epidemic diarrhoeal disease of viral origin in newborn swine. Ann. N. Y. Acad. Sci. 66: 186—190.
- HARADA K., FURUUCHI S., KUMAGAI T., SASAHARA J., 1969, Pathogenicity, immunogenicity and distribution of transmissible gastroenteritis virus in pigs. Natn. Inst. Anim. Hlth Q., Tokyo 9: 185—192.
- HOOPER B. E., Haelterman E. O., 1966, Concepts of pathogenesis and passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. J. Am. vet. med. Ass. 149: 1580—1586.

- JACKSON P. G. G., 1971, Transmissible gastroenteritis in pigs. *Vet. Rec.* 88: 560.
- KOLVEIT A. J., 1970, TGE vaccine needed-but circumspection too. *J. Am. vet. med. Ass.* 156: 529—530.
- LEE K. M., MORO M., BAKER J. A., 1954, A transmissible gastroenteritis in pigs. *Am. J. vet. Res.* 15: 364—373.
- LOGRIPPO G. A., HARTMAN F. W., 1955, Antigenicity of betapropiolactone inactivated virus vaccines. *J. Immun.* 75: 123—127.
- LOGRIPPO G. A., 1958, Antigenicity of combined betapropiolactone and ultraviolet inactivated virus vaccines. *J. Immun.* 80: 198—203.
- LOGRIPPO G. A., 1959, Investigations on the use of betapropiolactone in virus inactivation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 83: 578—594.
- LOGRIPPO G. A., 1969, Is there an effective acceptable procedure for virus removal? Status of Betapron (Propiolacton) for cold sterilization of biological products. *Vox Sang.* 17: 52—60.
- MC CLURKIN A. W., NORMAN J. C., 1966, Studies on TGE of swine. II. Selected characteristics of cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. comp. Med.* 30: 190—198.
- MC LEOD A. J., 1965, Vaccination against avian encephalomyelitis with betapropiolactone inactivated vaccine. *Vet. Rec.* 77: 335—338.
- MENŠÍK J., ŠTĚPÁNEK J., POSPÍŠIL Z., MESÁROŠ E., WATANABE H., MACURA B., PLEVA V., 1970, Morfologie, antigenní struktura, patogenita a diagnostika virů, izolovaných ze zaživacího traktu prasat. Závěrečná zpráva VÚVL Brno.
- NOBLE W. A., 1964, Methods used to the combat TGE. *Vet. Rec.* 76: 1497—1498.
- OLSON L. D., 1969, Several control measures used in an epizootic of transmissible gastroenteritis. *Cornell Vet.* 59: 426—430.
- POLONYI R., VRTIAK J. O., 1968, Inaktivační účinek betapropiolaktonu na virus klasičského moru hydiny. *Vet. Med. (Praha)* 13: 31—36.
- REED J. L., MUENCH H. A., 1938, Simple method of estimating fifty per cent endpoint. *Am. J. Hyg.* 27: 493—497.
- SAUNDERS C. N., 1964, Transmissible gastroenteritis. *Vet. Rec.* 76: 1504—1506.
- SHEFFY B. E., 1965, Characterization of transmissible gastroenteritis virus. *Proc. 69th. Ann. Meet. U. S. Livestock, Sanit. Ass.* 351—360.
- THORSEN J., DJURICKOVIC S., 1970, Experimental immunization of sows with cell-cultured TGE virus. *Can. J. comp. Med.* 34: 177—180.
- THORSEN J., DJURICKOVIC S., 1971, Experimental immunization of sows with inactivated transmissible gastroenteritis (TGE) virus. *Can. J. comp. Med.* 35: 99—103.
- WELTER C. J., 1965, TGE of swine. I. Propagation of virus in cell cultures and development a vaccine. *Vet. Med.* 60: 1054—1058.
- WITTE K. H., EASTERDAY B. C., 1967, Isolation and propagation of the virus of transmissible gastroenteritis of pigs in various cell cultures. *Arch. ges. Virusforsch.* 20: 327—350.

Došlo dne 22. 1. 1973

ШТЕПАНЕК Й., МЕНШИК Й., ПОСПИШИЛ З., РОЗКОШНЫ В. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Влияние формалина и бетапропиолактона на инфекционность и антигенность возбудителя вирусного гастроэнтерита свиней (ВГС). *Vet. Med. (Praha)* 18 (5): 269—280, 1973.

Вирус ВГС чувствителен к формалину и бетапропиолактону (БПЛ), которые его надежно инактивируют. Формалин активен еще в концентрации 0,01 %. Под его действием при 37 °C вирус теряет свою патогенную активность уже через 150 мин. При 4 °C процесс инаktivации замедляется, вирус еще спустя 24 часа инфекционный для тканевых культур, хотя его титр существенно падает. Конечная концентрация бетапропиолактона, достаточная для полной инаktivации вируса ВГС, — 0,05 %. После действия БПЛ вирус теряет не только свою способность размножаться на тканевых культурах, но становится и полностью неинфекционным для новорожденных поросят. При 37 °C инаktivация вируса 0,05 % БПЛ становится полной спустя 20 мин., тогда как при 4 °C — лишь спустя 16 час. Большее разбавление формалина (0,005 %—0,001 %) и БПЛ (0,01 %—0,001 %) вызывает лишь снижение титра. Вирус, инаktivированный лимитирующими концентрациями формалина и БПЛ, сохраняет свою иммуногенную активность и после внутримышечного введения индуцирует у свиней образование антител. Самые высокие уровни антител

отмечены после повторного введения вируса, инактивированного 0,05 % бетaproпиолактона при 4 °C.

вирусный гастроэнтерит свиней; инактивация; формалин; бетaproпиолактон; антигенность

ŠTĚPÁNEK J., MENŠÍK J., POSPÍŠIL Z., ROZKOŠNÝ V. [Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia]. *The Influence of Formalin and β -Propiolactone on the Infectivity and Antigenicity of the Originator of the Virus Gastroenteritis of Pigs (VGP)*. Vet. Med. [Praha] 18 (5) : 269—280, 1973.

The VGP virus is sensitive to the acting of formalin and β -propiolactone (BPL), and it is reliably inactivated by these substances. Formalin is still effective at concentration of 0.01 per cent. Because of its acting, at a temperature of 37 °C the virus loses its cytopathogenic activity already in 150 minutes. At 4 °C the process of inactivation is slower, so that the virus is still infectious for tissue cultures after 24 hours, even though its titre decreases substantially. The limit concentration of β -propiolactone for a complete inactivation of the VGP virus is 0.05 per cent. After the acting of BPL the virus loses not only its ability to multiply on tissue cultures, but it is completely non-infectious also for newly-born piglets. At 37 °C the inactivation of the virus by 0.05 per cent of BPL is complete in 20 minutes, whereas at 4 °C BPL must act for at least 16 hours. The effects of higher dilutions of formalin (0.005—0.001 per cent) and of BPL (0.01—0.001 per cent) causes only a lowering of the titre. The virus that has been inactivated by limiting concentrations of formalin and BPL retains its immunogenic activity, and after intramuscular application it indicates the forming of antibodies in pigs. The highest level of antibodies was recorded after a repeated application of the virus that had been inactivated with 0.05% of β -propiolactone at 4 °C.

virus gastroenteritis of pigs; inactivation; formalin; β -propiolactone; antigenicity

ŠTĚPÁNEK J., MENŠÍK J., POSPÍŠIL Z., ROZKOŠNÝ V. [Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei.] *Einfluß des Formalins und des Betapropiolaktons auf die Infektiosität und Antigenizität des Erregers der Virusgastroenteritis der Schweine (VGS)*. Vet. Med. [Praha] 18 (5) : 269—280, 1973.

Das VGS-Virus ist auf die Wirkung des Formalins und des Betapropiolaktons (BPL) empfindlich und wird mit diesen Stoffen verlässlich inaktiviert. Formalin wirkt noch in einer Konzentration von 0,01 %. Durch seine Wirkung bei 37 °C verliert das Virus seine zytopathogene Aktivität bereits in 150 Minuten. Bei 4 °C ist der Inaktivierungsprozeß langsamer, sodaß das Virus noch nach 24 Stunden für die Gewebekulturen infektiös ist, auch wenn sein Titer wesentlich verringert wird. Die zu einer vollkommenen Inaktivierung des VGS-Virus ausreichende Betapropiolakton-Limitkonzentration beträgt 0,05 %. Nach der BPL-Wirkung verliert das Virus nicht nur seine Fähigkeit sich auf Gewebekulturen zu vermehren, sondern ist auch vollkommen uninfektiös auch für neugeborene Ferkel. Bei 37 °C ist die Inaktivierung des Virus durch 0,05%-iges BPL vollkommen nach 20 Minuten, während bei 4 °C das BPL mindestens 16 Stunden wirken muß. Der Effekt der höheren Formalin (0,005 % — 0,001 %) und BPL (0,01 % — 0,001 %) — Verdünnungen erweist sich nur in einer Verminderung des Titers. Das mit limitierenden Formalin- und BPL-Konzentrationen inaktivierte Virus behält seine immunogene Aktivität und bei einer intramuskulären Applikation induziert es bei Schweinen die Antikörperbildung. Die höchsten Antikörperspiegel wurden nach einer wiederholten Applikation des mit 0,05%-igem Betapropiolaktone bei 4 °C inaktivierten Virus festgestellt.

Virusgastroenteritis der Schweine; Inaktivierung; Formalin; Betapropiolaktone; Antigenizität

Adresa autorů:

MVDr. I. Štěpánek, doc. MVDr. J. Menšík, CSc., MVDr. Z. Pospíšil, CSc., MVDr. V. Rozkošný, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, 621 32 Brno-Medlánky

FTALYLSULFATHIAZOL V PREVENCI A LÉČBĚ PRŮJMOVÝCH ONEMOCNĚNÍ NOVOROZENÝCH TELAT

J. Bartoš, J. Lebduška, J. Habrda

Výzkumný ústav veterinárního lékařství ČAZ, Brno

BARTOŠ J., LEBDUŠKA J., HABRDA J. *Ftalylsulfathiazol v prevenci a léčbě průjmových onemocnění novorozených selat*. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 281–290. 1973.

Zjišťovali jsme účinnost preventivně podávaného ftalylsulfathiazolu (Ftalazolu Spofa) v dávce 2 g 1× denně po dobu pěti až sedmi dní na vznik průjmů novorozených telat v deseti chovech celkem na 232 telatech. Dalšíh 240 telat ze stejných chovů tvořilo kontrolní skupiny bez prevence. Z celkového počtu 232 telat, jimž byl podáván Ftalazol preventivně, nastal průjem u 55,2 % telat. Z 240 telat kontrolních, u nichž nebyla prováděna prevence, onemocnělo 72,1 % telat. Tento rozdíl je statisticky významný ($P = 0,01$). Dále jsme sledovali, zda prevence Ftalazolem zvýší účinnost následné léčby Ftalazolem v dávce 3 g 2× denně, resp. 2 g 3× denně. Ze 128 telat léčených Ftalazolem po předchozí prevenci Ftalazolem se vyléčilo 96,1 %. Ze 173 telat léčených Ftalazolem bez předchozí prevence Ftalazolem se vyléčilo 98,8 %. Tento rozdíl není statisticky významný.

mláďata; telata; gastroenteritidy; prevence; ftalylsulfathiazol; Ftalazol; sulfonamidy; léčba; kolibacilózy

Experimentální údaje o preventivním účinku ftalylsulfathiazolu při gastroenteritidách novorozených telat, které by byly ověřeny na průkazných počtech zvířat (tj. alespoň na 50 telatech) a ve více chovech, jsme v dostupné literatuře nezjistili.

V domácí literatuře nacházíme jen zmínky o použití sulfonamidů v prevenci průjmových onemocnění telat. Šmíd (1966) obecně sděluje, že preventivní podávání sulfonamidů se neosvědčilo.

Také zahraniční údaje jsou velmi kusé, pokusy byly dělány převážně jen na velmi malých počtech telat, často bez bližšího určení příčiny průjmů, u telat různého stáří, v některých případech nakoupených na trzích od nejrůznějších chovatelů.

Candlin (1949) podával na jedné farmě preventivně 4 g ftalylsulfathiazolu po tři dny 46 telatům, z nichž onemocnělo 30 %. Naproti tomu z 16 kontrolních telat onemocnělo průjmem 68 %.

Pilugin (1956) uvedl, že před prvním příjmem mleziva dává telatům 0,5 až 1 g Ftalazolu a při dalších dvou napájeníh 0,5 g. Průjmy u telat takto ošetřených nenastaly. Neuvádí, u jakého počtu telat resp. chovů dosáhl těchto výsledků.

Dalton a kol. (1960) nakoupili na trhu telata z různých lokalit a různého stáří, většina z nich byla mladší než sedm dní. Telata dostávala při zastavení do pokusu mléko nebo sušené mléko. Skupina 10 telat dostávala profylakticky ftalylsulfathiazol v dávce 2,5 g 2× denně.

Druhá skupina 10 telat byla kontrolní. Všechna telata měla průjem. Z pokusné skupiny uhynula tři telata, z kontrolní čtyři.

Kolesov a kol. (1961) doporučili preventivně Ftalazol v dávce 1 g 3× denně, neuvádí však bližší údaje o výsledcích.

Tarasov (1965) podával Ftalazol 10 telatům a nezjistil profylaktický účinek. Neuvádí však dózování.

Léčebně jsme použili dávky 6 g *pro die* ftalylsulfathiazolu, kterou můžeme označit jako střední dávku doporučenou v literatuře. Agejev (1956) podával 2 g, Kolesov a kol. (1961) 3 g, Burluckij (1964) také 3 g, Grim (1957) 4 g, Rejman (1952) 4 až 6 g, Metcalf (1948) 6 g, Toglijev (1956) sestupně 8 — 6 — 4 g, Thorp a kol. (1944) 4 až 10 g, Candlin (1949) 12 g a Clara (1952) také 12 g. Z tohoto přehledu dostupné literatury je zřejmé, že chybí dosud číselné údaje o prevenční účinnosti ftalylsulfathiazolu.

Abychom vyplnili mezery v dosavadních znalostech, přezkoušeli jsme v této práci prevenční a léčebnou účinnost ftalylsulfathiazolu na větších počtech telat ve více chovech a vliv předchozí prevence na následné léčebné výsledky. Preventivní účinnost jsme hodnotili srovnáním s výskytem průjmů v kontrolních skupinách bez prevence.

MATERIÁL A METODA

Preventivně jsme podávali Ftalazol Spofa *ad usum vet.* tablety à 0,5 g od prvního dne života v dávce 4 tablety 1× denně, což jsou 2 g Ftalazolu *pro die* po dobu 5 až 7 dní, celkem v 10 chovech 232 telatům. První dávka byla podána hned s prvním mlezivem. V každém chovu byla sledována kontrolní skupina, v 10 chovech celkem 240 telat. Byl zachován ten postup, že každé tele narozené jako liché dostávalo prevenční prostředek, každé sudé bylo sledováno bez prevence. V případě, že se v pokusné nebo kontrolní skupině vyskytl u telete průjem, byla podávána léčebná dávka Ftalazolu Spofa, tj. 4 tablety 3× denně, resp. 6 tablet 2× denně, tedy 6 g *pro die*. Léčba trvala tak dlouho, dokud nedošlo k vyléčení a ještě o jeden až dva dny déle, aby se zabránilo možnému vzniku recidiv. Za recidivu byl považován návrat průjmu do čtyř dnů po vyléčení. Pokusy jsme dělali v období od 15. 4. 1971 do 10. 7. 1972 v chovech okresů Senica, Uherské Hradiště, Břeclav. Případy zalehnutí, omfaloflebitid a těžších bronchopneumonií jsme vylučovali z hodnocení. Mikrobiologicky jsme vyšetřovali orgány a obsah střev uhynulých telat. Kmeny *E. coli* jsme zařazovali podle biochemických a kultivačních vlastností (Sedláček, Rische 1961). Sérotypy izolovaných kmenů *E. coli* jsme zjišťovali pomalou zkumavkovou aglutinací pomocí sér patogenních sérotypů vyráběných Biovetou, n. p., v Ivanovicích, podle metody udané výrobcem.

V šesti chovech jsme zachytili patogenní sérotypy *E. coli*:

SS Nový Dvůr: 0 9, 0 15, 0 101, 0 117, 0 137, 0 115

JRD Čáčov: 0 78, 0 8, 0 15

JRD Hlboké: 0 101, 0 9

ŠM Dolné Suroviny: 0 101, 0 78

ŠM Čáry: 0 101, 0 9

SS Březolupy: 0 78

Ve zbývajících čtyřech chovech (ŠM Lakšárská N. Ves, ŠM Studien-

ka, ŠM Sotina, SS Vlasatice] jsme patogenní sérotypy nezjistili; z těchto chovů bylo dodáno jen jedno nebo vůbec žádné tele k pitvě.

V devíti chovech z deseti odchovávají telata sáním, pouze v chovu SS Březolupy používají metodu napájení.

Statistickou významnost výsledků jsme hodnotili testem χ^2 (Roth a kol. 1962, Myslivec 1957).

VÝSLEDKY

PREVENTIVNÍ ÚČINNOST

Z celkového počtu 232 telat, jimž byl podáván preventivně Ftalazol, nastal průjem u 55,2 %, průměrně za 5,6 dne (min. 0,5; max. 14 dní). Z 240 kontrolních telat bez prevence onemocnělo 72,1 % průměrně za 4,7 dne (min. 0; max. 12 dní). Tento rozdíl je statisticky významný ($P = 0,01$). Celý soubor pokusů je možné rozdělit na dvě skupiny:

Ve třech chovech (tab. I) u kontrolních skupin se průjem vyskytl

I. Účinnost Ftalazolu (2 g *pro die*) v prevenci průměrného onemocnění telat v chovech, v jejichž kontrolních skupinách mělo průjem 30,8 až 50,0 % telat

Chov	Období	Prevence	Počet telat	Průjem nastal				
				počet telat	%	onemocnění v den po narození		
						průměr	min.	max.
ŠM St	15. 4. — 18. 7. 1971	Ftalazol	28	9	32,1	4,4	1	9
		bez prevence	26	8	30,8	4,4	1	8
JRD HI	7. 1. — 9. 2. 1972	Ftalazol	20	15	75,0	7,7	2	13
		bez prevence	20	10	50,0	5,9	2	9
ŠM DS	23. 1. — 1. 5. 1972	Ftalazol	23	5	21,7	8,6	2	11
		bez prevence	23	11	47,8	3,8	1	7
Celkem tři chovy	15. 4. — 1. 5. 1971 1972	Ftalazol	71	29	40,8	6,9	1	13
		bez prevence	69	29	42,0	4,7	1	9

v mezích od 30,8 % do 50 % telat. V těchto chovech při preventivním podávání Ftalazolu onemocnělo průměrně 21,7 až 75 % telat. Souhrnem v těchto třech chovech onemocnělo 42,0 % ze 69 telat kontrolních a 40,8 % ze 71 telete pokusného. Tento rozdíl nebyl statisticky významný. Průjem ve skupině s prevencí nastával průměrně později, ve stáří 6,9 dne oproti skupině bez prevence, kde nastával průměrně ve stáří 4,7 dne. Procento výskytu průjmů bylo vyšší jednou ve skupině bez prevence, jednou ve skupině po předchozí prevenci. V třetím chovu byl výskyt průjmů v obou skupinách přibližně stejný. V tomto chovu nebyl zjištěn patogenní sérotyp, v obou předchozích chovech patogenní sérotypy zjištěny byly.

V sedmi chovech s těžším průběhem choroby (tab. II), ve kterých

II. Účinnost Ftalazolu (2 g *pro die*) v prevenci průjmového onemocnění telat v chovech, v jejichž kontrolních skupinách mělo průměr 75,0 až 96,9 ‰ telat

Chov	Období	Prevence	Počet telat	Průměr nastal				
				počet telat	‰	onemocnění v den po narození		
						průměr	min.	max.
ŠM La	15. 5.—16. 7. 1971	Ftalazol	20	19	95,0	5,1	2	8
		bez prevence	23	22	95,7	4,6	1	8
SS Bř	21. 5.—28. 6. 1971	Ftalazol	22	12	54,5	6,7	2,5	14
		bez prevence	20	15	75,0	4,3	1	8
SS ND	18. 9.—30. 10. 1971	Ftalazol	23	19	82,6	5,7	2	10
		bez prevence	32	31	96,9	6,6	2	10
ŠM So	10. 8.—15. 1. 1971 1972	Ftalazol	21	9	42,9	4,2	2	9
		bez prevence	22	17	77,3	5,3	1	12
ŠM Čá	5. 1.—12. 4. 1972	Ftalazol	29	9	31,0	4,7	1	7
		bez prevence	24	19	79,2	2,0	0	9,75
SS VI	2. 4.—17. 6. 1972	Ftalazol	22	12	54,5	2,4	0,5	4
		bez prevence	25	20	80,0	3,7	1	10
JRD Čá	11.5.—10. 7. 1972	Ftalazol	24	19	79,2	6,9	1,5	11
		bez prevence	25	20	80,0	5,6	2	8
Celkem sedm chovů	10.8.—10. 7. 1971 1972	Ftalazol	161	99	61,5	5,3	0,5	14
		bez prevence	171	144	84,2	4,8	0	12

III. Doba výskytu průjmů při prevenci Ftalazolem

Počet chovů	Počet telat		Průměr nastal				
			během prevence				
	celkem	s průměm	u počtu telat	%	za x dní od začátku prevence		
					průměr	min.	max.
Chovy, v jejichž kontrolních skupinách mělo průměr 30,8–50,0 % telat							
3	71	29	17	23,9	4,2	1	7
Chovy, v jejichž kontrolních skupinách mělo průměr 75,0–96,9 % telat							
7	161	99	73	45,3	3,9	0,5	9
Celkem všechny chovy dohromady, bez ohledu na to, kolik procent telat mělo							
10	232	128	90	38,8	4,0	0,5	9

se v kontrolních skupinách objevil průjem u 75 až 96,9 % telat, dala prevence příznivější výsledky, neboť v pokusných skupinách onemocnělo jen 31,0 až 95 % telat. V úhrnu všech sedmi chovů onemocnělo v kontrolních skupinách 84,2 % ze 171 telete, ve skupinách s prevencí jen 61,5 % ze 161 telete. Rozdíl je statisticky významný ($P = 0,01$). Ve všech sedmi chovech bylo ve skupinách s prevencí procento onemocnělých telat nižší než v odpovídajících skupinách kontrolních, i když ve dvou z těchto sedmi chovů byl rozdíl nepatrný. Byl to chov ŠM La, v němž jsme nezachytili patogenní sérotyp *E. coli* a chov JRD Čá. v němž jsme sice zachytili tři patogenní sérotypy *E. coli*, ale v němž byly také zjištěny kultivačně bedsonie (ÚSVÚ Brno).

Pro posouzení prevenční účinnosti má význam i ta okolnost, zda se průjem objevil již během podávání Ftalazolu, nebo až po ukončení aplikace (tab. III). Z celkového počtu 232 pokusných telat onemocnělo již během prevence 38,8 % zvířat, po skončeném podávání Ftalazolu 16,4 %. I zde se však projevil vliv stupně morbidit. Ve třech chovech, kde onemocnělo v kontrolních skupinách jen 30,8 až 50 % telat, objevil se průjem již během prevence u 23,9 % telat a u 16,9 % telat až po ukončení prevence. Naproti tomu v souboru sedmi chovů, v jejichž kontrolních skupinách mělo průjem více telat (75 až 96,9 %), onemocnělo již během prevence 45,3 % telat a u 16,1 % telat až po ukončení prevence. Převaha výskytu onemocnění již během přívodu léku je dalším ukazatelem, který nasvědčuje, že schopnost Ftalazolu zabránit vzniku průjmu neodpovídá očekávání a běžným představám.

LÉČEBNÁ ÚČINNOST (tab. IV)

Spojíme-li všechny pokusy s léčbou Ftalazolem (2 g 3× denně, resp. 3 g 2× denně), ať již této léčbě předcházela prevence či nikoliv, bylo v 10 chovech uzdraveno do šesti dní 95,3 % z 301 telete. Z toho po předchozí prevenci Ftalazolem se vyléčilo 93,8 % ze 128 telat, bez této prevence 96,5 % ze 173 telat. Rozdíl není statisticky významný, stejně

Průjem nastal							
až po ukončení prevence							
u počtu telat	%	ve stáří dnů			za x dní od začátku prevence		
		průměr	min.	max.	průměr	min.	max.
12	16,9	10,0	8	13	4,2	1	8
26	16,1	8,5	7	14	3,0	2	7
průjem v kontrolních skupinách							
38	16,4	8,9	7	14	3,3	1	8

IV. Léčba prŕjŕmŕ telat Ftalazolem (6 g pro die)

Chov	Období	Prevence	Počet lččených telat	Vylččeno do 6. dne		Prŕjem se zastavil za dní		
				počet telat	%	prŕmŕ	min.	max.
Chovy, v jejichŕ kontrolních skupinách mŕlo prŕjem 30,8–50,0 % telat								
3	15. 4.–1. 5.	Ftalazol	29	26	89,7	2,6	1	4,5
	1971 1972	bez prevence	29	29	100	2,8	1,5	5
Chovy, v jejichŕ kontrolních skupinách mŕlo prŕjem 75,0–96,9 % telat								
7	10. 8.–10. 7.	Ftalazol	99	94	94,9	3,4	1	6,5
	1971 1972	bez prevence	144	138	95,8	3,6	0,75	6,75
Celkem vŕechny chovy dohromady, bez ohledu na to, kolik procent telat mŕlo prŕjem								
10	15. 4.–10. 7.	Ftalazol	128	120	93,8	3,2	1	6,5
	1971 1972	bez prevence	173	167	96,5	3,5	0,75	6,75
Celkový vŕsledek lččby Ftalazolem s pŕedchozí prevencí i bez prevence								
10	15. 4.–10. 7. 1971 1972		301	287	95,3	3,4	0,75	6,75

Vysvŕtlivky: *) tele nedodáno k pitvŕ;

jako rozdíly v ostatních ukazatelích v tab. IV. Malá statistická významnost ($P = 0,1$) byla zjiŕŕena pouze u ŕhynŕ lččených telat; ve skupinŕ s pŕedchozí prevencí uhynulo více telat neŕ ve skupinŕ bez pŕedchozí prevence. Pŕedchozí prevence nezlepŕila tedy procento vylččených pŕípadŕ, ani prŕbŕh lččby, jak se jevil v ostatních sledovaných ukazatelích.

Tento celkový materiál z 10 chovŕ je moŕno rozdělit na dvŕ skupiny.

Ve tŕech chovech, v jejichŕ kontrolních skupinách onemocnŕlo prŕjem jen 30,8 % aŕ 50 % telat, bylo do ŕesti dní uzdraveno po pŕedchozí prevenci Ftalazolem 89,7 % z 29 telat, bez prevence 100 % z 29 telat. I kdyŕ tyto počty telat nejsou tak veliké, aby bylo moŕné pokládat čísla vylččených za definitivní, pŕece jen se ukazuje, ŕe prevence ponŕkud snížila vŕsledek následné lččby ($P = 0,1$). Avŕak pŕi porovnání obou skupin pŕi lččbŕ trvající dŕle neŕ ŕest dní nebyl jíž zjiŕŕen statisticky významný rozdíl mezi skupinami s prevencí a bez ní. Ani v ostatních sledovaných ukazatelích nebyly pŕŕkazné rozdíly. Ve vŕech tŕech chovech bylo uzdraveno do ŕesti dnŕ více telat ve skupinách, které nedostávaly preventivně Ftalazol.

V prŕmŕu sedmi chovŕ s vysokou morbiditou v kontrolních skupinách (75–96,9 % onemocnŕlých) byly vŕsledky lččby pŕibliŕně stejné v obou skupinách. Nepatrné číselné rozdíly nebyly signifikantní. Do ŕesti dní se uzdravilo po pŕedchozí prevenci Ftalazolem 94,9 % z 99 telat,

Vyléčeno od 7. dne stejným lékem		Recidivy		Nutné porážky		Úhyny % z léčených telat		Úhyny % z celkového počtu telat	
počet telat	%	počet telat	%	počet telat	%	počet telat	%	počet telat	%
27	93,1	1	3,4	0	0	2*)	6,9	2*)	2,8
29	100	1	3,4	0	0	0	0	0	0
96	97,0	4	4,0	1	1,0	2*)	2,0	2*)	1,2
142	96,6	5	3,5	1	0,7	1	0,7	1	0,6
v kontrolních skupinách									
123	96,1	5	3,9	1	0,8	4*)	3,1	4*)	1,7
171	98,8	6	3,5	1	0,6	1	0,6	1	0,4
294	97,7	11	3,7	2	0,7	5	1,6	5	1,1

bez prevence 95,8 % ze 144 telat. Ze sedmi chovů se uzdravilo během šesti dní více telat ve třech chovech bez předchozí prevence, ve dvou chovech po předchozí prevenci a ve dvou chovech se vyléčilo 100 % telat jak ve skupině s prevencí, tak i bez ní.

DISKUSE

Výsledky pokusů ukázaly, že prevence Ftalazolem může mít příznivý vliv jen v chovech, v nichž je morbidita větší než 50 %. V těchto chovech je kladný výsledek statisticky významný. Avšak i v chovech s vysokou morbiditou se mohou vyskytnout některé chovy, v nichž se neprokáže příznivý vliv preventivně podávaného Ftalazolu. V našem souboru to byl jeden chov, kde jsme neizolovali patogenní sérotypy *E. coli* a jeden chov, kde vedle patogenních sérotypů *E. coli* byly zjištěny kultivačně také bedsonie. Následná léčba Ftalazolem po jeho předchozí prevenční aplikaci se nezdá vhodná, neboť ve skupině s prevencí jsme zaznamenali více uhynulých telat. Také Candlin (1949) měl více uhynulých telat po předchozí prevenci Ftalazolem, než ve skupině kontrolní. I když jsme zjistili při léčbě Ftalazolem poněkud rychlejší uzdravování u skupiny, která dostávala preventivně Ftalazol, bude pro praxi výhodnější používat pro následnou terapii jiných terapeutik, především ze skupiny celkově působících léků.

V souhrnu všech 10 chovů při prevenci Ftalazolem v dávce 2 g *pro die* nenastal průjem u 44,8 % telat. Porovnáme-li tento výsledek s výsledky našich dřívějších pokusů, zjistíme, že z dosud námi zkoušených prevenčních prostředků byl nejúčinnější sulfadimidin, po němž nenastal průjem u 57,5 % telat (Bartoš, Lebduška, Habrda, Mrva 1972). Při použití Dietanu průjem nenastal u 48,7 % telat (Bartoš, Mrva 1972). Po Ftalazolu v těchto pokusech nenastal průjem u 44,8 % telat. Při použití Preventanu nenastal průjem u 43,1 % (Bartoš, Lebduška, Poláková 1970) a u 27,6 % (Lebduška, Bartoš 1970), při použití Therasanu nenastal u 28,7 % telat (Bartoš, Lebduška, Poláková 1970) a při použití Vitalinu nenastal průjem u 25,4 % telat (Lebduška, Bartoš 1970).

Z tabulek I a II o výsledcích prevence je patrné, že v různých chovech je účinnost značně odlišná. V praxi není možno předpovědět, zda v určitém jednotlivém chovu bude prevence úspěšná či aspoň blízká průměru z více chovů. Je také nutné mít na zřeteli, že ani v určitém stejném chovu v různých obdobích a za různých okolností nelze počítat se stejnou účinností.

Poděkování: Za spolupráci v chovech děkujeme okresním a obvodním veterinárním lékařům z OVZ Senica, Uh. Hradiště a Břeclav. Za technickou spolupráci děkujeme s. B. Seidlové.

Literatura

- AGEJEV S. A., 1956, Primenenije ftalazola pri rasstrojstvach funkcij želudočno-kišečnogo trakta u teljat. Veterinarija 33, 1: 55.
- BARTOŠ J., MRVA V., 1972, Dietan v prevenci a léčbě gastroenteritid novorozeneých telat. Veterinaria Spofa, 14, Supplement: 39—49.
- BARTOŠ J., LEBDUŠKA J., POLÁKOVÁ M., 1970, Prevetan a Therasan v prevenci kolibacilóz novorozeneých telat. Vet. Med. (Praha) 15, 11—12: 693—702.
- BARTOŠ J., LEBDUŠKA J., HABRDA J., MRVA V., 1972, Sulfadimidin v prevenci a léčbě průjemových onemocnění novorozeneých telat. Vet. Med. (Praha) 17, 11: 685—696.
- BURLUCKIJ I. D., 1964, Dispepsija novoroždennych teljat, jejo profilaktika i lečenie. Trudy uzb. nauč. issled. Inst. Vet. Samarkand, 16: 329—332.
- CANDLIN F. T., 1949, Sulfathalidine (phthalylsulfathiazole) in control of diarrhea in calves. J. Am. vet. med. Ass. 115: 261—262.
- CLARA I., 1952, Osservazioni sui moderni metodi di profilassi e terapia delle colibacillosi. Atti Soc. ital. Sci. vet., San Remo 6: 398—402.
- DALTON R. G., FISHER E. W., MCINTYRE W. I. M., 1960, Antibiotics and calf diarrhoea. Vet. Rec. 72, 51: 1186—1194.
- GRIM J., 1957, Klinické zkušenosti s léčbou enteritid telat phthalylsulfathiazolem (Ftalazolem). Dipl. práce, VF Brno.
- KOLESOV A. M., TARASOV I. I., KOLESOVA N. I., 1961, K voprosu dispepsiji u teljat. Veterinarija 38, 12: 46—48.
- LEBDUŠKA J., BARTOŠ J., 1970, Vitalin a Preventan v prevenci kolibacilóz novorozeneých telat. Vet. Med. (Praha) 15: 681—692.
- METCALF F. L., 1948, Sulfathalidine — its clinical use in dogs and calves. Vet. Med. 43: 83—84.
- MYSLIVEC V., 1957, Statistické metody zemědělského a lesnického výzkumnictví. Praha.
- PILJUGIN V. V., 1956, Naš metod vyraščivaniya teljat. Veterinarija 33, 12: 24—25.
- REJMAN CH. T., 1952, Novejšije sredstva dlja lečeniya ponosov u teljat. Veterinarija 29, 2: 26.
- ROTH Z., JOSÍFKO M., MALÝ V., TRČKA V., 1962, Statistické metody v experimentální medicíně. Praha.
- SEDLÁK J., RISCHE H., 1961, Enterobacteriaceae — Infektionen. Leipzig.

- ŠMÍD M., 1966, Zhodnocení léčby telat ve VKT v Trutnově podle jednotlivých druhů onemocnění. Veterinářství 16: 460—461.
- TARASOV I. I., 1965, Sravnitel'naja effektivnost' lekarstvennykh sredstv terapii i profilaktiki dispepsii u teljat. Trudy sarat. zoot. vet. Inst. 13: 205—209.
- THORP W. T. S., PISCIOTTA V. J., GRUNDY C. B., 1944, Sulfasuxidine and sulfathalidine for infectious calf scours. J. Am. vet. med. Ass. 104: 274—278.
- TOGLIEV, 1956, Primenenije ftalazola pri želudочно-kišечных заболеваниях i kokcidioze u teljat. Veterinarija 33, 1: 55.

Došlo dne 7. 12. 1972

БАРТОШ Й., ЛЕБДУШКА Й., ГАБРДА Й. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Фталилсульфатиазол в профилактике и лечении поноса новорожденных телят. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 281—290, 1973.

Нами изучалась эффективность профилактически подаваемого фталилсульфатиазола (Фталазол — Спофа) в дозе 2 г один раз в день в течение 5—7 дней на появление поноса новорожденных телят в 10 стадах (всего 232 теленка). Следующих 240 телят из того же стада представляло собой контрольную группу без профилактики. Из общего числа 232 телят, которым подавался Фталазол в виде профилактики, понос наблюдался у 55,2 % телят. Из 240 контрольных телят, у которых профилактика не проводилась, заболело 72,1 % телят. Эта разность статистически достоверна ($P = 0,01$). Далее нами изучалось, повышается ли эффективность профилактики Фталазолом при последующем лечении в дозе 3 г два раза в сутки, или 2 г три раза в сутки. Из 128 телят, получавших Фталазол после предшествующей профилактики Фталазолом, вылечилось 96,1 %. Из 173 телят, получавших Фталазол без предшествующей профилактики Фталазолом, вылечилось 98,8 %. Эта разность статистически недостоверна.

молодняк; телята; гастроэнтерит; профилактика: фталилсульфатиазол; Фталазол; сульфонамиды; лечение; колибациллез

BARTOŠ J., LEBDUŠKA J., HABRDA J. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). *Phthalylsulphathiazol in the Prevention and Therapy of Diarrhoeas in New-Born Calves*. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 281—290, 1973.

The effectivity of the preventive application of phthalylsulphathiazol (Ftalazol Spofa) in the dose of 2 g (once-daily for 5—7 days) on the occurrence of diarrhoeas in new-born calves was studied in 232 calves in 10 herds. Other 240 calves from the same herds formed the no-prevention control group. As to the group of calves preventively treated with Ftalazol, 55.2 % suffered from diarrhoea. In the group of 240 control calves in which no prevention was undertaken, 72.1 % of the calves were diseased. This difference is statistically significant. Furthermore, another study was conducted to reveal whether or not the Ftalazol prevention might increase the effectivity of the subsequent Ftalazol treatment in the doses of 3 g applied twice daily or 2 g applied three times daily. Of the 128 Ftalazol-treated calves to which the same drug had been applied preventively, 96.1 % were cured. Of the 173 calves treated with Ftalazol without preceding Ftalazol prevention, 98.8 % were cured. This difference is not statistically significant.

young animals; calves; gastroenterites; prevention; phthalylsulphathiazol; Ftalazol; sulphonamides; treatment; colibacillosis

BARTOŠ J., LEBDUŠKA J., HABRDA J. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Phthalylsulfathiazol in der Vorbeugung und Behandlung von Durchfallerkrankungen der neugeborenen Kälber*. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 281—290, 1973.

Wir haben die Wirksamkeit des präventiv verabreichten Phthalylsulfathiazols (Phthalasol Spofa) in der Gabe von 2 g 1× täglich im Laufe von 5 bis 7 Tagen auf die Durchfallentstehung bei insgesamt 232 neugeborenen Kälbern in 10 Zuchten ermittelt. Weitere 240 Kälber von denselben Zuchten haben dabei Kontrollgruppen gebildet. Aus der Gesamtzahl von 232 Kälbern, denen der Phthalasol präventiv verabreicht worden war, kam der Durchfall bei 55,2 % Kälbern zustande. Aus den 240 Kontrollkälbern,

bei denen keine Vorbeugung vorgenommen worden war, erkrankten 72,1%. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($P = 0,01$). Weiter haben wir verfolgt, ob die Phtalasolverbeugung die Wirksamkeit der nachfolgenden Phtalasolbehandlung in der Gabe von 3 g 2× täglich, bzw. 2 g 3× täglich erhöht. Aus den 128 nach vorherigen Vorbeugung wieder mit Phtalasol behandelten Kälbern wurden 96,1 % geheilt. Aus den 173 ohne vorherige Vorbeugung mit Phtalasol behandelten Kälbern wurden 98,8 % geheilt. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

Jungtiere; Kälber; Gastroenteritiden; Vorbeugung; Phtalylsulfathiasol; Phtalasol; Sulfonamide; Behandlung; Kolibazillose

Adresa autorů:

MVDr. J. Bartoš, CSc., prof. MVDr. J. Lebduška, DrSc., MVDr. J. Habrda,
Výzkumný ústav veterinárního lékařství ČAZ, 621 32 Brno-Medlánky

DIAGNOSTICKÝ VÝZNAM STANOVENÍ RYCHLOSTI POHYBU SPERMII BÝKŮ FOTOGAMMETRICKY A TESTEM PROPULSIVITY

Z. Věžník

Výzkumný ústav veterinárního lékařství ČAZ, Brno

VĚŽNÍK Z. *Diagnostický význam stanovení rychlosti pohybu spermií býků fotogrammetricky a testem propulsivity*. Vet. Med. [Praha] 18 (5): 291—302, 1973.

Testem propulsivity byla stanovena střední hodnota rychlosti pohybu spermií ve sledovaném souboru ejakulátů 60,4 $\mu\text{m/s}$, s korekcí na počet pohyblivých spermií 81,1 $\mu\text{m/s}$. Fotogrammetrickým vyšetřením byla stanovena průměrná rychlost pohybu spermií 74 $\mu\text{m/s}$. Srovnáním výsledků obou metod bylo zjištěno, že veličiny časového faktoru testu propulsivity odpovídají metrickým údajům fotometody v exponenciální závislosti. Informace, kterou poskytuje sledování rychlosti pohybu spermií, je významná svou časností odezvy. Zjištěný poločas snížení rychlosti spermií, vzhledem k výchozím hodnotám, byl dvě hodiny, zatímco v téže době dosahoval pokles živých spermií necelých 20 %. Lze předpokládat, že rozdíly mezi vizuálním hodnocením pohybu a procentem živých spermií jsou ovlivňovány rychlostí pohybu spermií. Výsledky nás opravňují tvrdit, že znalost rychlosti pohybu spermií je ukazatelem, který určuje mnohem výrazněji snižující se kvalitu ejakulátu, než např. pokles procenta živých spermií.

spermatologie; rychlost spermií; býk; laboratorní metody spermatologické

Přesné měření motility spermií bylo předmětem zájmu řady pracovníků, ale její praktické užití působí stále potíže. Běžně užívané metody odhadu stupně aktivity, získané přisouzením numerických hodnot podle zvolené stupnice aktivity, mohou být zcela orientační a není možné na ně klást požadavek přísně kvantitativní a objektivní. Tyto postupy jsou zatíženy ještě heterogeničností, která existuje v každém ejakulátu. Každé semeno obsahuje buňky inaktivní a mezi aktivními spermii může být mnoho různých stupňů aktivity. Jak počet aktivních buněk, tak jejich stupeň aktivity klesá exponenciálně s časem.

Otázka motility spermií je většinou dosud stále spojována s možností dosáhnout lokality v samičím pohlavním ústrojí, kde dochází k prvním stadiím fertilizace. Pro experimentátora je bez diskuse motilita velmi důležitým kritériem, poněvadž je známkou vysokého stupně fyziologické integrity buňky. Obtíže, které jsou však spojeny s jejím objektivním určením, značně zeslabují její použitelnost. Druhou stránkou je otázka, zda motilita je indikátorem plné funkční kompetence. Na základě řady prací (Drimmelen a Oettlé 1949, Bishop a Hancock 1951, Austin a Bishop 1958 a další) je možné prokázat, že i abnormální spermie mohou být motilní a přece zcela infertilní. Kromě toho je známo, že normální spermie ztrácejí dříve fertilitu než motilitu. Na druhé straně nepohyblivost spermií nemusí vždy znamenat, že jde o buňky mrtvé.

Již v roce 1935 použili Schenk a Kahman k hodnocení aktiv-

ních spermií metodu kinematografickou. Touto cestou šla řada autorů (Chandraschkar 1943, Rotschild 1953) a jedno z posledních sdělení podává Müller a Szilacyi (1964) a Müller (1967), který užil metody spermiofotogrammetrie, spočívající na časovém snímku ředěného ejakulátu fázově kontrastní mikroskopickou technikou.

Kinematografická metoda může poskytnout podrobné informace k frekvenčnímu rozdělení rychlosti pohybu v celé populaci. Její stinnou stránkou je pracnost. Potíže nespočívají jen v technice fotografické, ale i v náročném vyhodnocování pohybu velkého počtu jednotlivých spermií, tedy měření vzdáleností, které každá spermie urazila během konstantního času. Na druhé straně je to jediná metoda, která podává přesné informace o charakteristice pohybu (Erbslöh 1971).

Metoda, kterou vypracovali pro stanovení aktivity spermií Baker a kol. (1957), skýtá možnost získat velmi podrobné informace bez užití fotografické techniky. U nás její praktické využití v modifikaci Hyníeho (1960) je záležitostí humánní medicíny.

Tato metoda, označovaná jako stanovení propulsivity spermií, je založena na závislosti počtu volně plovoucích spermií procházejících přes úsek roviny v daném čase, na rozměrech tohoto úseku, na koncentraci spermií v suspenzi a na rychlosti pohybu.

Vzájemné srovnání metody fotogrammetrie a stanovení propulsivity a výsledků jimi získaných jsme nenašli v žádném dostupném sdělení. Vzhledem k významu, který je možné připsat poznání rychlosti pohybu spermií i z hlediska praktické diagnostické využitelnosti, věnovali jsme toto pozorování stanovení rychlosti pohybu spermií v daném souboru ejakulátů a posouzení vhodnosti uvedených dvou metod.

Touto prací bychom chtěli přispět současně k poznatkům o významu faktoru rychlosti pohybu spermií při kvalitativním hodnocení ejakulátů.

MATERIÁL A METODY

Ejakuláty byly po získání do umělé pochvy vyšetřovány v laboratoři jednak způsobem rutinně užívaným v provozních laboratořích, jednak bylo použito metod dovolujících přesné kvalitativní určení počtu živých a mrtvých buněk (Věžník 1967). K ředění ejakulátů byl použit fyziologický roztok vyrovnaný na pH 6,8 fosfátovým pufrem.

Spermiofotogrammetrie byla prováděna na mikroskopu Zetopan fy Reichert, s použitím fázového kontrastu, objektivem 16/0,32, projekčním okulárem Meopta F4 a závěrkou Prontor-Press s expozicí $\frac{1}{4}$ vteřiny s tolerancí nepřesahující $\pm 10\%$. Ejakulát byl ředěn 1:10 a nativní preparát pořízen tak, aby v zorném poli bylo přibližně 60 až 100 elementů. K výpočtu rychlosti byly použity standardně provedené pozitivy, na nichž byl posun spermií odečítán posuvným měřítkem.

Propulsivita spermií byla sledována v komůrce Thomově o hloubce 0,02 mm a byl stanoven časový faktor t , který odpovídal průchodu 100 spermií přes jednu stranu malého čtverečku počítací komůrky v jednom i ve druhém směru. Šlo tedy v podstatě o průchod prostorem o hranách 0,05.0,02 mm, tedy plochou 0,0010 mm². Ejakuláty byly ředěny na konstantní koncentraci 25 000 v mm³.

Aby nedošlo ke zkreslení výsledků subjektivní chybou jednoho pracovníka, byla rutinní technika hodnocení aktivity spermií bodovým systémem prováděna několika pracovníky. Naopak metody, u nichž lze předpokládat objektivní podklady, byly vyhodnocovány pracovníky v těchto technikách zpracovávajícími.

Celkem bylo zhodnoceno 120 ejakulátů a výsledky byly graficky vyhodnoceny. Posouzeny byly jednak výchozí hodnoty získané od čerstvých ejakulátů, dále pro zvýraznění vlivu změn rychlosti pohybu spermií na vizuální způsob hodnocení výsledky po jednohodinovém i vícehodinovém uchovávání ejakulátu při 39 °C.

VÝSLEDKY

Rychlost pohybu spermií, stanovená testem propulsivity, byla vyjádřena časovým faktorem $[t]$. Závislost tohoto ukazatele na počtu živých spermií je uvedena v tab. I.

I. Vztah časového faktoru testu propulsivity a jeho přepočít na rychlost pohybu spermií k procentu živých spermií v ejakulátu

Hodnota testu propulsivity v t vyjádřeno ve vteřinách	Živé spermie v ejakulátu v %	Hrubá rychlost spermií v ejakulátu $\mu\text{m/s}$	Přepočtená rychlost živé spermie v ejakulátu $\mu\text{m/s}$
50	80,0	113	119
60	80,3	94	110
70	75,3	81	105
80	78,3	71	92
90	73,9	63	87
100	73,8	56	82
110–140	66,9	47	72
150–190	66,3	33	50
200–290	61,2	27	45
300	45,2	19	43

K vyjádření rychlosti pohybu spermií v ejakulátu za 1 vteřinu byl použit přepočít časového faktoru použitím výpočtu uváděného Bakere a kol. (1957).

$$\text{Rychlost spermií v mm/min.} = \frac{100}{1} \cdot \frac{1}{0,05 \text{ mm}} \cdot \frac{\text{mm}^3}{25\,000} \cdot \frac{1}{0,70711} \cdot \frac{60}{\text{čas [s]}} = \frac{339,4}{\text{čas [s]}}$$

Na sledovaném souboru ejakulátů se výsledné hodnoty rychlosti pohybu spermií pohybovaly za vteřinu od 13 $\mu\text{m/s}$ do 113 $\mu\text{m/s}$. Po korekcích na rychlost pohybu živých spermií se rychlost pohybovala od 43 $\mu\text{m/s}$ do 119 $\mu\text{m/s}$.

Z výsledku bylo tedy zřejmé, že rozdílné hodnoty časového ukazatele byly nejen důsledkem různého procenta živých spermií, ale i jejich různé aktivity.

Střední hodnota rychlosti pohybu spermií, stanovená testem propulsivity, byla v ejakulátu 60,4 $\mu\text{m/s}$ s korekcí na pohyblivé spermie 81,1 $\mu\text{m/s}$.

Spermiofotogrammetrická sledování jsme provedli obdobně u téže skupiny ejakulátů ve spojení s hodnocením procenta živých a mrtvých spermií. V těchto případech měření byly ejakuláty ředěny rutinně v poměru 1:10. K výpočtu rychlosti pohybu spermií z naměřených délek stop pohyblivých spermií na fotografech jsme použili vzorce:

$$V = \frac{(D_1 - D_2) \cdot \text{konst.}}{D_2 \cdot T}$$

kde: D_1 — průměrná veličina délek stop pohyblivých spermií

D_2 — průměrná veličina nanášených délek hlaviček nepohyblivých spermií

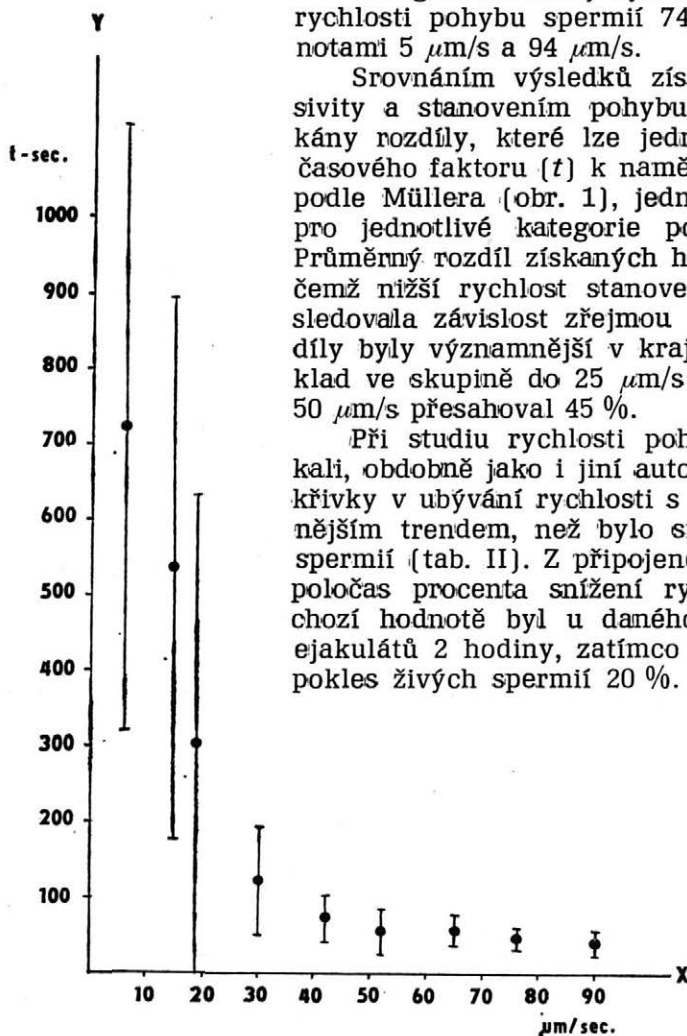
konst. — průměrná délka hlavičky spermie v μm (9 μm)

T — osvitový čas

Fotogrammetricky byla zjištěna střední hodnota rychlosti pohybu spermií 74 $\mu\text{m/s}$ s mezními hodnotami 5 $\mu\text{m/s}$ a 94 $\mu\text{m/s}$.

Srovnáním výsledků získaných testem propulsivity a stanovením pohybu fotomericky byly získány rozdíly, které lze jednak vyjádřit ve vztahu časového faktoru (t) k naměřené rychlosti metodou podle Müllera (obr. 1), jednak porovnáním hodnot pro jednotlivé kategorie podle rychlosti pohybu. Průměrný rozdíl získaných hodnot byl asi 10 %, při čemž nižší rychlost stanovená testem propulsivity sledovala závislost zřejmou na obr. 1, to jest rozdíly byly významnější v krajních hodnotách, například ve skupině do 25 $\mu\text{m/s}$ byl rozdíl 43 % a nad 50 $\mu\text{m/s}$ přesahoval 45 %.

Při studiu rychlosti pohybu spermií jsme získali, obdobně jako i jiní autoři, obraz exponenciální křivky v ubývání rychlosti s časem, a to s významnějším trendem, než bylo snížení procenta živých spermií (tab. II). Z připojené tabulky je zřejmé, že poločas procenta snížení rychlosti spermií k výchozí hodnotě byl u daného souboru sledovaných ejakulátů 2 hodiny, zatímco v téže době dosahoval pokles živých spermií 20 %.



1. Vztah hodnot t propulsivity spermií k jejich rychlosti pohybu v μm za vteřinu

Osa X μm za vteřinu

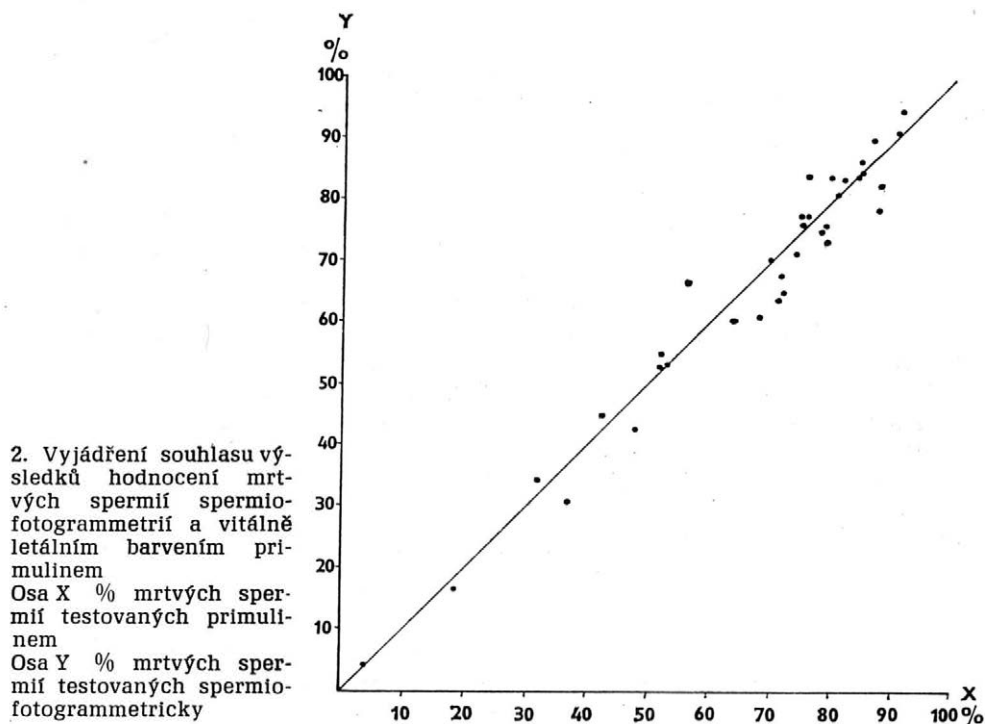
Osa Y časový faktor testu propulsivity ve vteřinách

σ průměry a směrodatné odchylky získaných hodnot

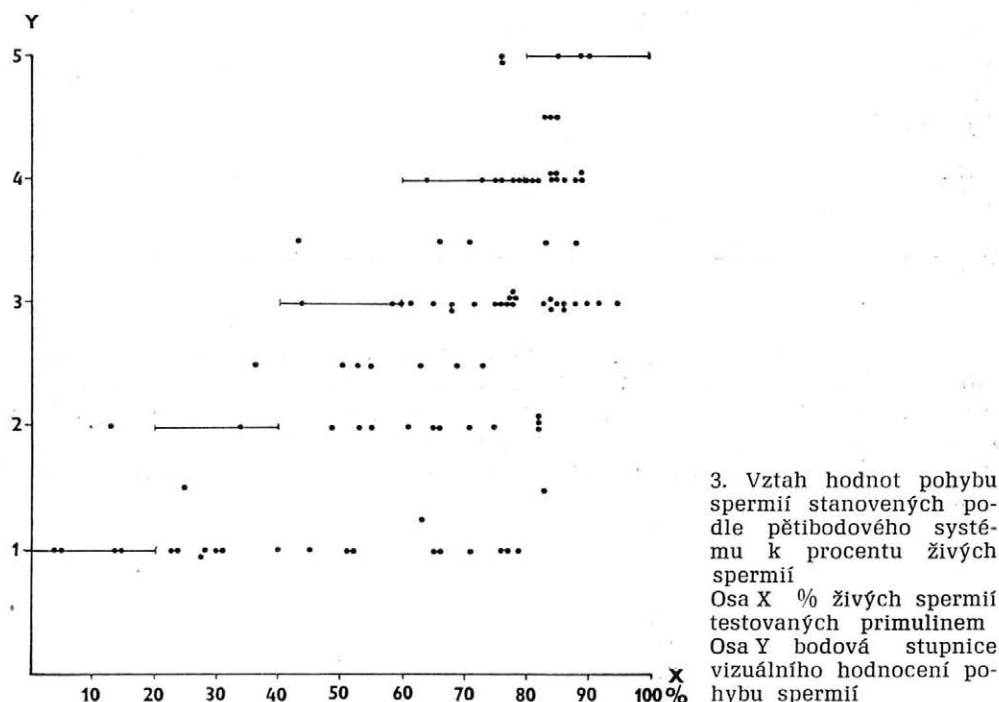
II. Pokles procenta živých spermií a rychlosti pohybu v ejakulátu

Průměry vyjádřeny v %	Hodiny				
	0	1	2	3	4
Pokles % živých	100	91,2	82,7	77,9	70,2
$S \bar{x}$	—	12,1	19,3	27,4	25,9
$S \bar{x}$	—	3,9	16,4	9,1	8,6
Pokles rychlosti	100	—	50,3	—	21,5
$S \bar{x}$	—	—	19,9	—	14,6
$S \bar{x}$	—	—	6,5	—	4,8

Sledovali jsme, do jaké míry souhlasí vizuální hodnocení aktivity spermií s výsledky testu vitálně letálního barvení primulinem. U každého vzorku bylo ověřeno, že primulinový test dal věrohodné výsledky. Kontrola byla provedena fotogrammetricky a bylo shledáno, že pohybující se elementy nebyly zbarveny a zbarvené elementy nevykazovaly pohyb (obr. 2).



Literární poznámky o nepřesnosti vizuálního posuzování aktivity spermií nás vedly k porovnání výsledků hodnot získaných vizuálním posouzením pohyblivosti spermií a procenta živých spermií, podle výsledků primulinové testace, za předpokladu vyplývajícího z uvedených závěrů.



Z obr. 3 je zřejmé, že získané hodnoty vizuálního testování bodovým systémem a výsledek primulinového testu nevykázal shodu. Posun doprava jasně prokazuje, že při vizuálním hodnocení dochází k ovlivnění posuzovatele a k podhodnocení posuzovaného materiálu. Na tomto ovlivnění se uplatňuje rychlost pohybu spermií jako zkreslující faktor. Pokusili jsme se proto prokázat, do jaké míry je zřejmá vztahnost hodnot naměřených vizuálním bodovacím systémem a objektivně naměřené rychlosti spermií jednak fotogrammetricky, jednak testem propulsivity.

Na obr. 4 je zřejmé, že závislost fotogrammetricky získaných hodnot rychlosti spermií v μm je lineární, zatímco hodnoty časového faktoru testu propulsivity probíhají exponenciálně. Po propočtu těchto hodnot na skutečnou rychlost v μm získáváme křivku, která svým průběhem zcela odpovídá křivce časového faktoru testu propulsivity (obr. 5). Je zřejmé, že maximum diference hodnot je v rozmezí 1,5–3,5 bodu stupnice vizuálního hodnocení pohybu spermií, kteréžto úseky si v obou křivkách vzájemně odpovídají.

Tyto dosavadní vývody nás vedly k srovnání dynamiky poklesu procenta živých spermií, rychlosti pohybu spermií a konečně hodnot sledování aktivity spermií vizuálně (obr. 6).

4. Vztah vizuálního hodnocení pohybu spermí k hodnotám spermiofotogrammetrickým a časovému faktoru testu propulsivity

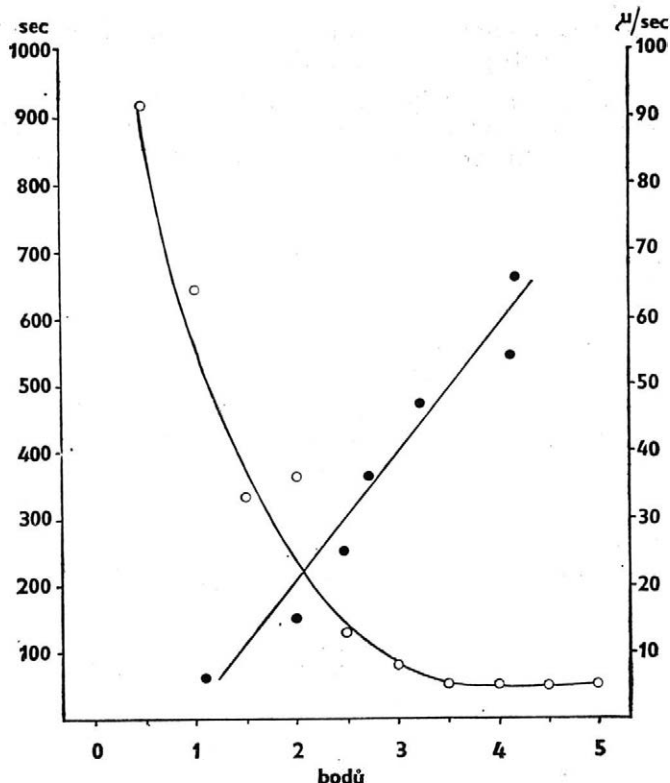
Osa Y vlevo vteřiny časového faktoru testu propulsivity

Osa Y vpravo rychlost pohybu spermí μm za vteřinu

Osa X body vizuálního hodnocení pohybu spermí

○ hodnoty časového faktoru testu propulsivity

● hodnoty rychlosti spermí, hodnocené spermiofotogrammetricky



Trend uvedených křivek jasně ukazuje, že informace, kterou nám poskytuje sledování rychlosti pohybu spermí, je významná svou časností odezvy. Lze předpokládat, že odklon křivky vizuálního hodnocení

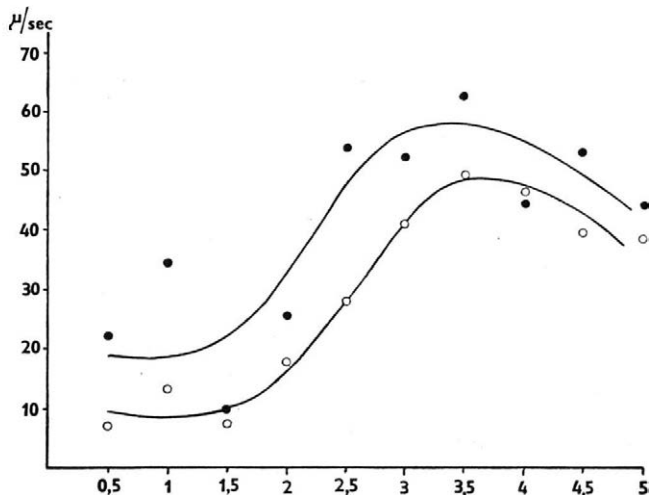
5. Výpočet rychlosti spermí přepočtem t faktoru testu propulsivity ve vztahu k vizuálnímu hodnocení pohybu

Osa X body vizuálního hodnocení pohybu

Osa Y rychlost pohybu v μm za vteřinu

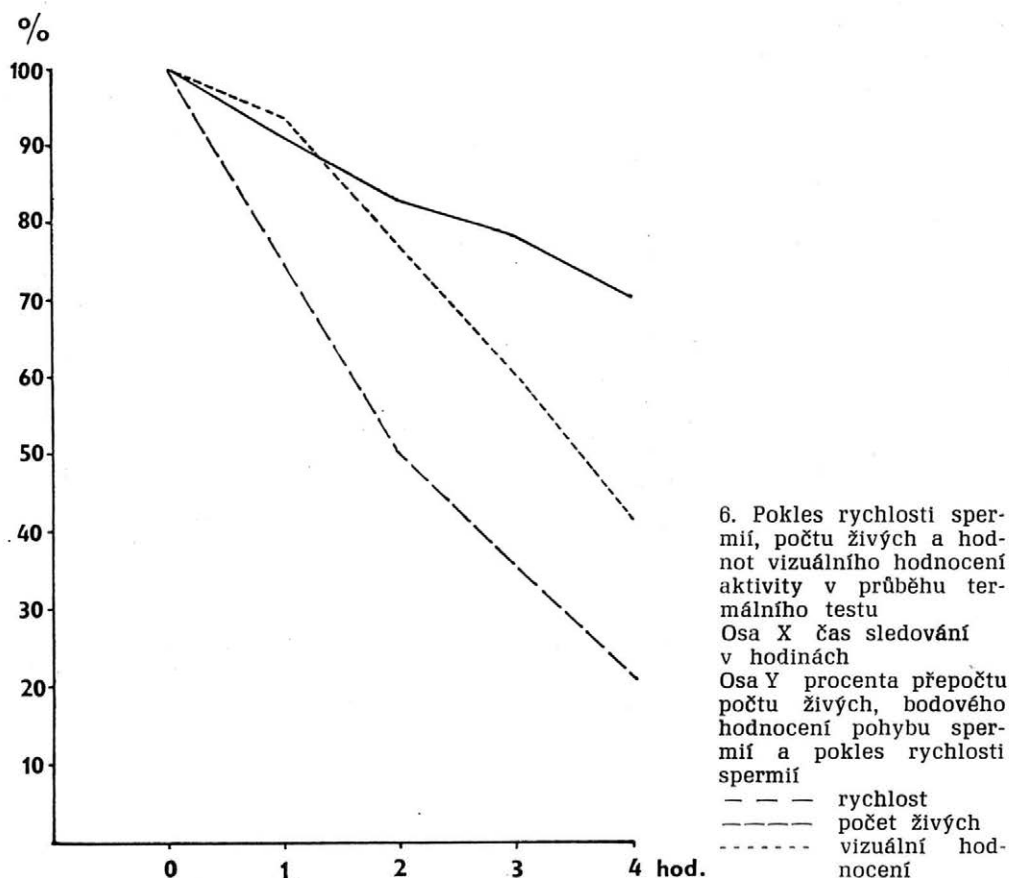
○ hodnoty rychlosti pohybu, přepočtené na celkovou koncentraci

● rychlost pohybu spermí po přepočtu na % živých



od křivky poklesu procenta živých spermií je ovlivňován právě hodnotami rychlosti pohybu spermií.

Doložené vývody nás opravňují tvrdit, že znalost rychlosti pohybu spermií je ukazatelem, který určuje mnohem výrazněji snižující se kvalitu ejakulátu, než například sledování poklesu procenta živých spermií.



DISKUSE

Přihlédneme-li k výsledkům jednotlivých autorů, kteří se zabývali měření rychlosti pohybu býčích spermií, můžeme si povšimnout poměrně značného rozdílu v získaných hodnotách. Tak Moelner a Van Demark (1955) metodou prostého měření získali průměrnou rychlost 114 $\mu\text{m/s}$ s rozpětím 10 až 352 $\mu\text{m/s}$. Rotschild (1953) udělal kinematografický záznam pohybu býčích spermií v suspenzi a určil průměrnou rychlost 123 $\mu\text{m/s}$ se směrodatnou odchylkou 39. Když započítal amotilní spermie, činila průměrná rychlost 117 $\mu\text{m/s}$. Zavedením dodatečného počtu pravděpodobnosti byla průměrná rychlost včetně amotilních 111 $\mu\text{m/s}$ se směrodatnou odchylkou 25,4. Autoři Baker a kol.,

kteří použili poprvé metody měření propulsivity, stanovili průměrnou rychlost pohybu býčích spermií s vyloučením amotilních buněk 70,5 $\mu\text{m/s}$. Müller (1967) stanovil rychlost spermií v čerstvých ejakulátech s variační šíří podílu pohyblivých spermií 70—90 % na 50—90 $\mu\text{m/s}$. Při výpočtu na průměrné procento živých spermií 77 % byla rychlost jejich pohybu stanovena na 57 $\mu\text{m/s}$.

Naše výsledky jsou v rámci veličin získaných jednotlivými autory, ale je zřejmé, že použitými metodami stanovená rychlost pohybu spermií je v našich pozorováních poněkud vyšší. Vysvětlení musíme hledat v prostředí, v němž suspendované spermie byly. Naše pokusy byly pro návaznost na další testy založeny na ředění ejakulátu pufrovaným fyziologickým roztokem. Vztah prostředí k pohyblivosti spermií byl vzpomenuť v práci Müllerově (1967) a také ve studii Hyniého (1960). Müller (1967) uvádí, že zvyšuje-li se viskozita ředidla od 1,1 na 2 cpoisy, snižuje se rychlost pohybu spermií podle ředění ze 70 na 53 $\mu\text{m/s}$. Jako ředidlo odpovídající viskozitě 2 cpoise uvádí Natri. citrát 2,3 + Glykokol 0,5 + želatina 0,5 + vaječný žloutek 25 % — toto ředidlo odpovídá viskozitou metodickým postupům Rikmenspoela (1957) a dalších autorů. Také výsledné rychlosti spermií v těchto ředidlech byly více méně shodné. Naproti tomu ředidlo ve složení Natri. citrát 2,3 + Glykokol 0,5 mělo 1,05 cpoise a spermie v něm vykazovaly vyšší průměrnou rychlost. Také Hynie (1960) usuzuje, že ředění značně mění propulsivitu pravděpodobně v důsledku toho, že vazké koloidní prostředí se stává přidáním krystaloidů fyziologického NaCl roztoku tekutější.

Rozdíl ve výsledcích získaných metodou fotogrammetrie a testem propulsivity lze vysvětlit ve shodě s Hyniém (1960) i Müllerem (1967) určitým stupněm selektování pohybujících se spermií při optických postupech hodnocení. U metod, při kterých se vymykají měření spermie s malou nebo velmi malou rychlostí pohybu, dochází ke zkreslení ve smyslu vyšších průměrů. Tak dokazuje i Müller (1967), že jeho výsledky jsou v průměru o 20 $\mu\text{m/s}$ menší než údaje Rikmenspoela (1957).

Podle našich názorů hraje zde roli i faktor koncentrace spermií, procento živých buněk, metoda přípravy preparátu a testu a konečně i sám přepočít časového faktoru na průměrnou dráhu, kterou spermie urazí za vteřinu.

Naše zjištění o nepřesnosti vizuálního hodnocení jsme mohli podložit i nálezy Müllera (1967), který uvádí, že hodnoty získané odhadem především u dobrých ejakulátů jsou poněkud nižší než údaje získané fotogrammetricky. Podle jeho názoru bylo všeobecně považováno za velmi řídký případ, vyskytoval-li se ejakulát s podílem více než 75 % živých pohyblivých spermií. Zlepšením posouzení ejakulátů spermiofotogrammetrií dosahovalo ve skutečnosti procento pohyblivých spermií nezdědka 80, 85 nebo i 90 %.

Povšimneme-li si našich výsledků, je zřejmá shoda s uvedenými nálezy Müllera (1967) neboť výchozí hodnoty sledovaných ejakulátů velmi často přesahovaly dokonce i 90 %.

Tyto údaje jsou dokladem o všeobecně uznávaném zkreslení hodnot získaných vizuálním způsobem testování pohyblivosti spermií. Naše pozorování shrnutá v tomto směru v grafickém vyjádření (obr. 2) byla

záměrně vedena snahou zvýšit vliv faktoru rychlosti spermií sledováním nejen výchozích hodnot pozorovaných ejakulátů, ale i hodnocením ejakulátů po určitou dobu udržovaných v tepelných lázních. Snižuje-li se rychlost pohybu ve výraznějším trendu než pokles procenta živých, pak při odklonu křivky vizuálního hodnocení ke křivce poklesu rychlosti můžeme úvahy o vzájemném ovlivňování považovat za reálné.

Platí-li pro ejakulované semeno výsledky pozorování Younga (1931), který zjistil, že při delším setrvávání spermií v nadvarleti dochází ke kvalitativní degradaci spermií — nejdříve ztrácejí spermie schopnost dát vznik životnému embryu, potom mizí schopnost oplodnění a nakonec se ztrácí pohyblivost, přičemž však morfologicky do této doby nebyly spermie změněny, pak tento poznatek zvýrazňuje význam informace o kvalitě pohybu při hodnocení ejakulátu.

Závěrem lze konstatovat, že kvalitativní hodnocení pohybu spermií doplňuje paletu spermatologických kritérií o přístupnou a přínosnou metodu.

Technická spolupráce D. Švecová a I. Bojok.

Literatura

- AUSTIN C. R., BISHOP M. W. H., 1958, Capacitation of Mammalian spermatozoa. *Nature* 181: 851.
- BAKER F., GRAGLE R. G., SALISBURY G. W., Van DEMARK N. L., 1957, Spermatozoa velocities *in vitro*. A simple method of measurement. *Fert. Steril.* 8: 149—155.
- BISHOP M. W. H., HANCOCK J. L., 1951, cit. podle PARKES A. S., 1960, *Marshall's Physiology of Reproduction*. London.
- DRIMMELEN G. C. van, OETLE A. G., 1949, Changes in sperm quality. *Proc. Soc. Study Fertil.* 5.
- ERBSLÖH J., 1971, Bewegungsstudien an Samenzellen des Bullen im kinematographischen Bildes. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 78: 661—663.
- HYNIE J., 1960, Index propulsivity spermií. *Čs. dermatologie* 35: 11—16.
- CHANDRASCHKAR S., 1943, Stochastic problems in physics and astronomy. *Rev. Mod. Phys.* 15: 1.
- MOELNER A. N., Van DEMARK N. L., 1955, *In vitro* Speeds of Bovine Spermatozoa. *Fert. Steril.* 6: 506.
- MÜLLER E., SZILACYI J. E., 1964, Eine fotografische Methode zur Objektiven Beurteilung der Beweglichkeit von Spermien in verdünnten Bullenejakulaten. *Sborník V. Kongresu o reprodukci, Trento*.
- MÜLLER E., 1967, Fotogrammetrické vyšetření motility zředěných ejakulátů býků. Referát na semináři „O aktuálních otázkách umělé inseminace hospodářských zvířat“, Brno.
- PARKES A. S., 1960, *Marshall's Physiology of Reproduction*. London.
- RIKMENSPOEL E., 1957, Photoelectric and Cinematographic Measurements of the „Motility“ of Bull Sperm Cells. *Utrecht*.
- ROTSCHILD, 1953, The Movements of Spermatozoa. In: *Ciba Foundation Symposium, Mammalian Gun Cells*. Boston, 122 s.
- SCHENK, KAHMAN, 1935, cit. RIKMENSPOEL E., 1957.
- VEŽNÍK Z., 1967, Použití primulinu k vitálně-letálnímu barvení ve spermologii. *Veterinářství* 17: 65—68.
- VEŽNÍK Z., 1970, Beitrag zur Bedeutung einiger Bewertungsmethoden des Stiersamens. *Zeszyty problemowe postepow nauk rolniczych* 108: 159—168.
- VEŽNÍK Z., 1970, Vybrané spermatologické metody vhodné pro rozšíření rutinních hodnocení býčích ejakulátů. *Metodiky ÚVTI*.
- YOUNG W. C., 1931, A study of the function of the epididymis. III: Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens of the guinea-pigs. *J. exp. Biol.* 8: 151.

Došlo dne 3. 1. 1973

ВЕЖНИК З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии ЧСХА, Брно, Чехословакия). Диагностическое значение определения скорости движения сперматозоидов быков путем фотограмметрического определения и теста отталкивания. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 291—302, 1973.

При помощи теста отталкивания определяли среднюю скорость движения сперматозоидов в изучаемой совокупности эякулятов $60,4 \mu\text{m}/\text{сек.}$, с поправкой количества подвижных сперматозоидов $81,1 \mu\text{m}/\text{сек.}$ При помощи фотограмметрического исследования определена средняя скорость движения сперматозоидов $74 \mu\text{m}/\text{сек.}$ Сравнение результатов обоих методов показало, что величины хронологического фактора теста отталкивания отвечают метрическим данным фотометода в экспоненциальной зависимости. Информация, приобретаемая в ходе изучения скорости движения сперматозоидов, ценна своевременностью реакции. Установленный полупериод сокращения скорости сперматозоидов составил 2 часа (по сравнению с исходными величинами), тогда как сокращение живых сперматозоидов достигало в то же время нецелых 20%. Можно предполагать, что различия между зрительной оценкой движения и % живых сперматозоидов обусловлены скоростью движения сперматозоидов. Результаты позволяют констатировать, что знание скорости движения сперматозоидов — показатель, который определяет ухудшающееся качество эякулята гораздо отчетливее, чем, например, сокращение процента живых сперматозоидов.

сперматология; скорость сперматозоидов; бык; лабораторные сперматологические методы

VĚŽNÍK Z. (Veterinary Research Institute, Czech Academy of Agriculture, Brno, Czechoslovakia). The Diagnostic Importance of the Determination of Sperm Movement Rate by the Photogrammetric Method and by the Propulsivity Test. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 291—302, 1973.

The propulsivity test was employed to determine the mean value of the rate of the movement of spermatozoa in the studied set of ejaculates; the value was $60.4 \mu\text{m}/\text{s}$, with correction to the number of mobile spermatozoa $81.1 \mu\text{m}/\text{s}$. The average rate of the movement of spermatozoa determined by the photogrammetric method was $74 \mu\text{m}/\text{s}$. The comparison of the results of the two methods revealed that the values of the time factor of propulsivity test corresponded with the metric data of the photo-method, in exponential dependence. The information obtained from the examination of the movement rate of spermatozoa is important due to its response earliness. The half-life of the decrease of sperm movement rate determined in relation to the initial values was 2 hours, whereas at the same time, the decrease in live spermatozoa reached less than 20%. It may be supposed that the differences between the visual evaluation of movement and the percentage of live spermatozoa are affected by the rate of sperm movement. It can be claimed, using the results, that the knowledge of rate of the movement of spermatozoa is an index expressing the decreasing quality of ejaculate with much larger deal of accuracy than, for instance, the decrease of the percentage of live spermatozoa.

spermatology; sperm movement rate; bull; laboratory methods of spermatology

VĚŽNÍK Z. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin der ČAZ, Brno, Tschechoslowakei.) Diagnostische Bedeutung der Ermittlung der Bewegungsgeschwindigkeit von Bullenspermien durch photogrammetrische Untersuchung und Propulsivitätstest. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 291—302, 1973.

Anhand des Propulsivitätstestes wurde der mittlere Geschwindigkeitswert der Spermienbewegung im untersuchten Ejakulatenkomplex auf $60,4 \mu\text{m}/\text{s}$ festgelegt, mit Korrektur angesichts der beweglichen Spermien auf $81,1 \mu\text{m}/\text{s}$. Durch photogrammetrische Untersuchung wurde die durchschnittliche Geschwindigkeit der Spermienbewegung auf $74 \mu\text{m}/\text{s}$ festgelegt. Beim Vergleich der Ergebnisse beider Methoden wurde festgestellt, daß die Größen des Zeifaktors im Propulsivitätstest den metrischen Angaben der Photomethode in exponentieller Abhängigkeit entsprechen. Die bei der Untersuchung der Bewegungsgeschwindigkeit von Spermien ermittelte Information ist wegen der Widerhallfrühzeitigkeit bedeutend. Die ermittelte Halbwertszeit der Geschwindigkeitsabnahme von Spermien im Vergleich zu den Ausgangswerten betrug 2 Stunden, während die Abnahme der lebenden Spermien in der gleichen Zeit nahezu 20% erreichte. Es ist vorauszusetzen, daß die Unterschiede zwischen der visuellen Be-

wegungsauswertung und dem Prozentsatz der lebenden Spermien von der Bewegungsgeschwindigkeit der Spermien beeinflusst werden. Die Ergebnisse berechtigen uns zu behaupten, daß die Kenntnis der Bewegungsgeschwindigkeit von Spermien ein Zeiger ist, der die sinkende Ejakulatsqualität viel deutlicher bestimmt als z. B. die Abnahme des Prozentanteils von lebenden Spermien.

Spermatologie; Spermengeschwindigkeit; Bulle; spermatologische Labormethoden

Adresa autora:

MVDr. Z. Věžník, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství ČAZ,
621 32 Brno-Medlánky

EXHALÁTY VÝCHODOSLOVENSKÝCH ŽELEZIARNÍ A ICH ÚČINOK NA OVCE A HOVĎZÍ DOBYTOK V EXPERIMENTÁLNÝCH PODMIENKACH

R. Cabadaj, L. Slanina

Vysoká škola veterinárska, Košice

CABADAJ R., SLANINA L. *Exhaláty Východoslovenských železiarní a ich účinek na ovce a hovädzí dobytok v experimentálnych podmienkach.* Vet. Med. (Praha) 18 (5): 303—313, 1973.

Bolo prevedené klinické, hematologické a biochemické vyšetrenie u 16 pokusných oviec proti 6 kontrolám a u 3 kusov dvaapoloročných jalovic po perorálnom podávaní popraškov z aglomerácie a oceliarne VSŽ. Pokus bol prevedený v klinicko-laboratórnych podmienkach a trval 72 dní. U oboch pokusných skupín oviec sa na piaty až siedmy deň objavila výrazná diarhoea, ktorá sa opakovala v 7 až 10dňových intervaloch a bola doprevádzaná miernou apatiou a inapetenciou. Pri patologicko-anatomickej pitve bola zistená mierna hypertrofia črevnej sliznice a koniôza mezenterálnych miazgových uzlín. Z laboratórnych vyšetrení bolo nápadné zvýšenie obsahu hemoglobínu, hematokritovej hodnoty, erytrocytôza, leukocytoza. Zvýšená bola aktivita glutamovej oxáloctovej a glutamovej pyrohroznovej tranzaminázy ako aj alkalické fosfatázy. Pri sledovaní celkového bilirubínu, alkalické rezervy, celkových bielkovín, bielkovinných frakcií, fosforu, horčíka, medi a železa nebola zistená podstatná zmena. U hovädzieho dobytku bola zistená významná hypokalcémia.

ovce; hovädzí dobytok; exhaláty; klinické prejavy; laboratórne vyšetrenie

Znečisťovanie životného prostredia predstavuje pre súčasného človeka obdobnú hrozbu ako veľké cholerové nákazy, nečakané povodne alebo ničivé vojny. Vyvoláva rôzne ochorenia a ročne na jeho následky predčasne umiera mnoho obyvateľov. Spoločnosť sa však začala proti znečisťovaniu brániť nielen legislatívou a administratívnymi opatreniami, ale i novými technickými vynálezmi a zdokonalenou technológiou.

Po roku 1950 v ČSSR s prudkým rozmachom industrializácie bol zaznamenaný stúpajúci trend priemyselných otráv ako dôsledok exhalácií rôznych priemyselných podnikov. Následky havárie v Elektrárni Nováky boli opísané predovšetkým v prácach Bartíka a Havasého (1963), Ferencíka a kol. (1967, 1968).

Exhalátmi Hlinikárne v Žiari nad Hronom sa zaoberajú Halaša a Ferencík (1960), Ferencík (1961), Nárožný (1965), Hašek a kol. (1965) a celá rada ďalších autorov. Problém znečisťovania ovzdušia Magnezitovými závodmi v Košiciach riešili Gdovin (1966), Gdovin a Vrzgula (1967 a, b), Slanina a kol. (1969).

V českých zemiach sú to predovšetkým práce Maška (1967), Maška a Haisa (1964 a, b; 1965 a, b). Maška a kol. (1965), ktoré pojednávajú o problémoch exhalácií na hospodárske zvieratá v okolí ostravských hutných kombinátov.

Ochranu ovzdušia v súvislosti s výstavbou Východoslovenských že-

leziarní (VSŽ) rozoberajú Michalus a Porázik (1964), Pajeda a Bielcková (1964), Humhál a Petryšín (1969). Vplyv exhalátov VSŽ na zdravotný stav hovädzieho dobytku v prvých rokoch výrobnéj činnosti závodu popisuje Cabada (1971). Cieľom našej práce bolo preveriť vplyv exhalátov v VSŽ na ovce a hovädzí dobytok po ich perorálnej aplikácii v experimentálnych podmienkach.

MATERIÁL A METÓDY

Pokus bol prevedený na dvoch skupinách oviec plemena merino (v každej osem pokusných zvierat oproti piatim kontrolám) a na troch dvaapoločročných jaloviciach slovenského žltostakatého plemena. Sledovanie trvalo 72 dní a pokusným zvieratám bol denne do krmiva pridávaný poprašok z dvoch najväčších závodov VSŽ — oceliarne a aglomerácie v dávke 0,18 g na kg živej váhy a deň, (t. j. priemerný ročný prašný spád prepočítaný na denný príjem zo zeleného krmiva). Hovädziemu dobytku bol podávaný poprašok z oceliarne v rovnakej dávke na kg ž. v. a po rovnakú dobu.

Percentuálne zloženie popraškov:

Oceliareň		Aglomerácia	
Fe ₂ O ₃	85,50	Fe	44,47
CaO	5,60	SiO ₂	14,48
SiO ₂	2,50	FeO	13,08
MnO	2,40	CaO	12,99
FeO	1,45	MgO	2,72
P ₂ O ₅	0,46	Al ₂ O ₃	2,34
Al ₂ O ₃	0,40	Mn	0,70

Denná krmná dávka oviec pokusných i kontrolných bola rovnaká. Pozostávala z 0,5 kg jačmenného šrotu, sena, soli a vody *ad libitum*. Denná dávka pre jeden kus hovädzieho dobytku pozostávala z 10 kg lúčneho sena, 8 kg krmnej repy, 2 kg jačmenného šrotu, 5 gramov minerálnej zmesi, soľ a voda *ad libitum*. Krmivá pochádzali z oblastí nezamorených exhalátmi.

Všetky zvieratá boli pred zaradením do pokusu podrobne klinicky vyšetrené. Zároveň bolo prevedené parazitologické vyšetrenie kože, vlny, srsti a trusu. Do pokusu boli vybrané len klinicky zdravé kusy s negatívnym laboratórnym nálezom. Klinický stav sa sledoval v priebehu celého pokusu.

V krvi sa sledovalo: obsah hemoglobínu v g% Sahliho hemometrom, hematokritová hodnota Wintrobovým hematokritom, počet erytrocytov a leukocyto bankovou metódou, diferenciálny krvný obraz, aktivita cholinesterázy v erytrocytoch fotometricky. V krvnom sére bol zisťovaný: vápnik a horčík (Vrzgula 1960), fosfor (Hořejší a kol. 1957), železo (Heilmayer a Plötnner 1937), meď (Heilmayer a Plötnner 1941), alkalická rezerva (Holasek a Flaschka 1961), alkalická fosfatáza (Homolka 1956), celkový bilirubín (Jandrassik a Grof 1938), glutamová oxáloctová transamináza a glutamová pyrohroznová transamináza (Reitman-Frankel cit.

Neuman, Maděrová 1960), celkové bielkoviny (Hořejší a kol. 1957), bielkovinné frakcie (Wagenhofer.)

Štatistické vyhodnotenie bolo prevedené Wilcoxonovým testom (Roth a kol. 1962), pričom hladina významnosti je vyjadrená symbolmi: NS — rozdiely súborov nevýznamné, S — rozdiely súborov na 5% hladine významnosti, SS — rozdiely súborov na 2% hladine významnosti, SSS — rozdiely súborov na 1% hladine významnosti. Hodnoty pokusnej skupiny s poklesom oproti kontrolám boli v tabuľkách značené znamienkom — a hodnoty so vzostupom oproti kontrolám znamienkom +.

VÝSLEDKY

Výsledky sú zhrnuté do tabuliek I až VI. V oboch pokusných skupinách oviec sa na piaty až siedmy deň objavila výrazná diarhoea, ktorá sa opakovala v sedem až desaťdňových intervaloch až do ukončenia pokusu. Hnačka bola výraznejšia u oviec, ktoré dostávali poprašok z aglomerácie. V priebehu sledovania sa u pokusných oviec striedali obdobia miernej apatie a zníženej chuti, v časovej zhode s hnačkami.

U hovädzieho dobytku sa diarhoické stavy objavovali podobne ako u pokusných oviec, avšak apatia a znížená chuť do žrania nebola zistená. Vplyv pokusu na živú váhu zvierat je uvedený v tab. I.

Po záverečnom vyšetrení, na 72. deň od začiatku pokusu, sa vykonala porážka pokusných a kontrolných zvierat s dôkladnou patologicko-anatomicou pitvou. U väčšiny pokusných zvierat sa zistila mierna hypertrofia črevnej sliznice a koniôza mezenterálnych miazgových uzlín. Iné patologickomorfologické zmeny neboli zistené. U zvierat v kontrolnej skupine sa nezistili žiadne zmeny.

Pri zaradení do pokusu a po jeho ukončení sa od všetkých zvierat odoberala vlna a srst na toxikologické vyšetrenie zamerané na prítomnosť arzénu. Výsledky vyšetrenia boli negatívne.

LABORATÓRNE VYŠETRENIA

Výsledky vyšetrenia krvi a krvného séra so symbolmi štatistického vyhodnotenia sú uvedené v tab. II. až VI.

Pri sledovaní červenej a bielej krvnej zložky v obidvoch pokusných skupinách i u hovädzieho dobytku bolo zistené stúpanie hodnôt hemoglobínu, hematokritovej hodnoty, počtu erytrocytov a leukocytov. Vzostup bol štatisticky významný na 2 až 1% hladine významnosti, výraznejší u skupiny zvierat, ktorá dostávala poprašok z oceliarne VSŽ. Aktivita cholinesterázy v erytrocytoch bola menlivá a nevýrazná. V diferenciálnom krvnom obraze u obidvoch pokusných skupín oviec neboli zistené trvalejšie alebo podstatnejšie rozdiely, avšak u hovädzieho dobytku bolo badať miernu eozinofíliu a pri ukončení pokusu aj neutrofiliiu a lymfocytopéniu.

Enzymatické reakcie, zamerané na funkciu pečene, stúpali úmerne s dĺžkou trvania pokusu. Výraznejší vzostup SGOT bol zistený u skupiny oviec po podávaní popraškov z aglomerácie. Stúpanie SGPT bolo zisťované u obidvoch skupín oviec i hovädzieho dobytku. Alkalická fosfatáza javila u oboch skupín oviec i u hovädzieho dobytku zvýšenú

I. Vplyv skrmovania popraškov z VSŽ na živú váhu oviec a hovädzieho dobytku

Agglomerácia				Oceliareň				Kontrola				Hd oceliareň			
čís.	váha pred	váha po	roz-diel	čís.	váha pred	váha po	roz-diel	čís.	váha pred	váha po	roz-diel	čís.	váha pred	váha po	roz-diel
1	32,0	31,0	- 1,0	1	36,0	38,0	+2,0	1	33	35	+2	1	350	380	+30
2	23,0	23,5	+ 0,5	2	36,0	31,5	-4,5	2	28	30	+2	2	320	350	+30
3	31,0	30,0	- 1,0	3	19,0	23,5	+4,5	3	42	43	+1	3	400	420	+20
4	24,0	20,0	- 4,0	4	36,5	33,0	-3,5	4	38	38	0				
5	47,0	43,0	- 4,0	5	41,0	39,0	-2,0	5	33	31	-2		1070	1150	+80
6	47,5	45,0	- 2,5	6	19,0	20,0	+1,0								
7	37,0	36,0	- 1,0	7	30,0	29,0	-1,0		174	177	+3	Prírastok na kus +26			
8	38,0	38,0	0,0	8	32,0	30,0	-2,0								
	279,5	266,5	-13,0		249,5	244,0	-5,5								

Prírastok na kus -1,6

Prírastok na kus -0,7

Prírastok na kus +0,6

II. Hematologické ukazovatele u oviec a hovädzieho dobytku

	Deň pokusu	Hb		Hk		Er		Le	
		p	k	p	k	p	k	p	k
Ovce	0	8,98 SS-	9,31	31,00 S-	34,00	5,42 NS	5,95	7,30 NS	8,70
oceliareň	20	10,42 SSS+	9,79	37,00 SSS+	38,00	5,88 SSS+	5,72	9,50 SSS+	7,80
nP = 8	48	9,76 SSS+	8,80	34,00 SSS	34,00	6,69 SSS+	5,71	9,30 SSS+	8,40
nK = 5	72	9,15 SS-	10,40	36,00 SSS+	35,00	6,38 SS+	6,19	9,40 SSS+	8,40
Ovce	0	8,64 S-	9,31	31,00 S-	34,00	5,34 NS	5,95	7,40 S-	8,70
aglomerácia	20	9,96 SS+	9,79	34,00 SS-	38,00	5,40 SSS-	5,72	7,10 NS	7,80
nP = 8	48	9,20 SSS+	8,80	35,00 SSS+	34,00	6,10 SSS+	5,71	10,80 SSS+	8,40
nK = 5	72	8,80 SS-	10,40	33,00 SS-	35,00	5,89 SSS-	6,19	7,70 SS-	8,40
Hd	0		9,49		34,00		5,55		6,63
oceliareň	20		10,42		35,00		5,32		7,80
nP = 3	48		10,02		38,60		5,43		10,50
	72		10,08		38,30		5,52		10,20

III. Diferenciálny krvný obraz u oviec a hovädzieho dobytká

	Deň pokusu	Eo		Ba		Seg		Tyč		Ly		Mo	
		p	k	p	k	p	k	p	k	p	k	p	k
Ovce oceliareň nP = 8 nK = 5	0	2,50 SSS+	0,50	1,75 SS+	0,50	32,50 SS-	41,00	0,37 SS+	0,50	62,25 SS+	57,25	0,62 SS+	0,25
	20	2,16 SS+	1,75	1,83 SS+	0,25	31,16 NS	39,75	0,50 NS	1,00	62,83 SS+	56,75	1,50 SS+	0,50
	48	2,85 SS-	3,75	1,71 SS+	1,25	34,14 SS+	30,00	0,85 SS+	0,25	58,71 SS-	64,25	1,71 SS+	0,50
	72	2,14 SS+	1,66	0,42 SS+	0,33	38,85 SS-	40,33	0,57 SS+	0,00	56,42 SS-	57,33	1,57 SS+	0,33
Ovce aglomerácia nP = 8 nK = 5	0	1,75 SSS+	0,50	2,75 SS+	0,50	30,75 SS-	41,00	1,37	0,50	62,25 NS	57,25	1,12 SS+	0,25
	20	4,00 SSS+	1,75	1,66	0,25	31,66 NS	39,75	0,50 NS	1,00	61,33 SS+	56,75	0,83 SS+	0,50
	48	2,33 SS-	3,75	1,50 SS+	1,25	32,66 SS+	30,00	0,50 SS+	0,25	62,00 NS	64,25	1,00 SS+	0,50
	72	3,28 SS+	1,66	1,28	0,33	38,85 SS-	40,33	0,85	0,00	54,71 NS	57,33	1,00 SS+	0,33
Hd oceliareň nP = 3	0	1,33		1,00		32,33		0,66		64,33		0,33	
	20	2,00		1,50		32,00		0,50		63,00		1,00	
	48	3,50		1,50		32,00		1,50		60,00		1,50	
	72	2,66		0,66		50,00		0,33		45,66		0,66	

IV. Cholinesteráza v erythrocytoch, alkalická rezerva v plazme a sledované enzymatické reakcie v sére oviec a hovädzieho dobytká

	Deň pokusu	Che		GOT		GPT		Bil		AF		AR	
		p	k	p	k	p	k	p	k	p	k	p	k
Ovce oceliareň nP = 8 nK = 5	0	26,40 SSS+	23,00	104,20 SS+	86,00	13,80	24,30	0,33 SS-	0,40	10,99 SS+	10,92	50,82 SS+	49,94
	20	—		90,00 SSS+	78,00	10,20	16,00	0,27 SSS+	0,22	12,42 S-	12,48	53,11 S-	53,30
	48	21,40	16,10	106,00 SS+	97,60	18,80	18,60	0,18 SSS+	0,15	12,95 SS-	13,25	54,68 SS+	51,29
	72	29,45 SSS+	24,20	119,00 SS+	97,20	21,20	11,60	0,14 SS+	0,04	16,56 SSS+	12,38	53,13 SSS+	49,27
Ovce aglomerácia nP = 8 nK = 5	0	21,50 SSS-	23,00	109,00 SS+	86,00	21,00	24,30	0,30 NS	0,40	5,82 NS	10,92	55,42 SS+	49,94
	20	25,00	—	122,80 SSS+	78,00	27,75	16,00	0,25 SSS+	0,22	7,15 NS	12,48	55,65 SSS+	53,30
	48	22,45	16,10	133,20 SSS+	97,60	30,22	18,60	0,24 SSS+	0,15	7,25 SSS-	13,25	53,03 SSS+	51,29
	72	26,20 SSS+	24,20	148,00 SSS+	97,20	28,20	11,60	0,36	0,04	11,61 SSS-	12,38	50,29 SSS+	49,27
Hd oceliareň nP = 3	0	47,30		75,30		18,20		0,37		7,44		55,84	
	20	44,30		70,00		20,00		0,25		9,06		54,12	
	48	—		86,00		21,00		0,18		5,27		55,25	
	72	44,30		105,00		29,00		0,06		9,82		54,20	

V. Celkové bielkoviny a bielkovinné frakcie krvného séra u oviec a hovädzieho dobytká

	Deň pokusu	Cb		Alb		Globulíny		Globulíny		Globulíny	
		p	k	p	k	p	k	p	k	p	k
Ovce	0	7,43 SS+	7,19	48,60 SS+	47,25	19,80 SSS-	28,50	3,70 SS-	4,00	28,10 SS+	20,25
oceliareň	20	7,68 SSS+	7,31	38,00 NS	41,00	23,00 NS	26,38	17,00	0,00	22,50 SS-	32,62
nP = 8	48	7,47 SSS+	7,01	44,40 SS-	51,00	19,00 NS	25,16	14,00 SS-	13,33	22,60 SS+	10,50
nK = 5	72	7,36 SSS+	7,20	32,00 NS	37,50	22,00 NS	27,25	3,57 NS	2,75	41,00 SS+	32,50
Ovce	0	7,02 SS-	7,19	40,75 SS-	47,25	11,75 SS-	28,50	13,50	4,00	34,00	20,25
aglomerácia	20	7,45 SSS+	7,31	38,25 SSS-	41,00	15,25 SS-	26,38	14,87	0,00	31,62 SS+	32,62
nP = 8	48	6,95 SS-	7,01	38,75	51,00	13,12	25,16	15,00	13,33	33,12	10,50
nK = 5	72	7,28 SSS+	7,20	37,28 SSS-	37,50	13,00 SS-	27,20	16,57	2,75	33,14 SS+	32,50
Hd	0	7,69		44,00		21,66		9,00		25,33	
oceliareň	20	7,14		32,00		23,00		14,00		31,00	
nP = 3	48	7,30		44,25		22,75		—		33,00	
	72	7,55		37,00		15,50		7,50		39,00	

VI. Sérové minerálne u oviec a hovädzieho dobytká

	Deň pokusu	Ca		P		Mg		Cu		Fe	
		p	k	p	k	p	k	p	k	p	k
Ovce	0	8,62 NS-	9,18	8,08 NS	7,00	2,68 S+	2,52	66,60 S+	64,00	136,00 SS+	110,00
oceliareň	20	9,24 SS	9,24	7,27 SS-	8,30	2,78 SS-	2,81	80,60 NS	73,60	148,00 S-	161,00
nP = 8	48	9,19 S-	9,34	6,42 NS	8,30	2,95 SSS+	2,69	80,10 SSS-	99,40	176,00 SSS+	155,00
nK = 5	72	9,26 NS	9,47	7,31 S-	8,60	2,33 SSS-	2,69	88,00 SSS+	76,20	177,00 SSS-	188,60
Ovce	0	8,80 NS	9,18	5,30	7,00	2,28 NS	2,52	68,00 SSS+	64,00	145,00 SS+	110,00
aglomerácia	20	9,41 SS+	9,24	7,02	8,30	2,58 SS-	2,81	60,00 SSS-	73,60	151,00 SS-	161,00
nP = 8	48	8,78 NS	9,34	7,86 SSS+	8,30	2,79 SSS+	2,69	75,00 S-	99,40	153,00 SSS-	155,00
nK = 5	72	8,91 NS	9,47	7,10 SS-	8,60	2,85 SSS+	2,69	79,80 SSS+	76,20	182,00 SS-	188,00
Hd	0	10,00		6,90		2,37		43,00		159,00	
oceliareň	20	8,61		8,50		2,39		78,50		148,00	
nP = 3	48	9,06		7,10		2,55		62,00		141,00	
	72	8,24		9,20		2,44		66,30		142,00	

aktivitu. Obsah celkového bilirubínu pri zahájení pokusu bol na hornej fyziologickej hranici. V priebehu pokusu u kontrolných oviec mal výrazne klesajúcu tendenciu, u skupiny oviec po poprašku z oceliarne bol zaznamenaný pokles, u oviec, ktoré dostávali poprašok z aglomerácie, bol v priebehu pokusu len nepatrný pokles a pri poslednom odbere bol zakončený miernym vzostupom. U hovädzieho dobytky mal výrazne klesajúcu tendenciu.

Alkalická rezerva u oviec po podaní poprašku z oceliarne zaznamenala stúpanie, naproti tomu u oviec po poprašku z aglomerácie bol zisťovaný pokles; u hovädzieho dobytky bola hladina alkalickej rezervy takmer vyrovnaná.

Hladina celkových bielkovín u pokusných a kontrolných zvierat bola skoro nevýznamná. Percentuálne zastúpenie albumínov u všetkých zvierat malo klesajúcu tendenciu. Hladina betaglobulínov u oviec po podaní poprašku z oceliarne vykazovala vzostup a návrat k východzej hodnote. U oviec po poprašku z aglomerácie boli hodnoty približne na rovnakej úrovni. Podobnú dynamiku bolo badať aj u hovädzieho dobytky. Hodnoty gamaglobulínov u oviec po skrmovaní poprašku z aglomerácie boli takmer na rovnakej úrovni. U dobytky bol zisťovaný trvalý vzostup gamaglobulínov; u oviec po poprašku z oceliarne bol zaznamenaný pokles a pri poslednom odbere rapidný vzostup.

V obsahu sérového vápnika u oviec po skrmovaní obidvoch popraškov nebolo badať zjavné výkyvy. U hovädzieho dobytky po poprašku z oceliarne došlo k významnej hypokalcémii. Stúpajúca hladina anorganického fosforu sa zistila v sére hovädzieho dobytky. U oviec po skrmovaní poprašku z oceliarne bol pozorovaný mierny pokles, zatiaľ čo u oviec po poprašku z aglomerácie, ako aj u kontrol, sa po prvom odbere zvýšil a držal na takmer vyrovnanej hladine. Obsah sérového horčíka v kontrole i v pokuse nejavil podstatnejších rozdielov. Pri sledovaní sérovej medi u hovädzieho dobytky bola zisťovaná ustálená hladina okrem odberu pri zahájení pokusu, keď u hovädzieho dobytky bola hladina mierne znížená. Hladina sérového železa vykazovala mierne stúpanie u oboch skupín oviec, ale i v kontrole. U hovädzieho dobytky boli hodnoty takmer na jednej úrovni.

DISKUSIA

Intenzita klinických príznakov u oviec, spojená s úbytkom na živej váhe alebo relatívne nižšími prírastkami u hovädzieho dobytky, bola úmerná dĺžke pokusu. Zreteľne bola narušená funkcia tráviaceho traktu (nechutenstvo, hnačky), nervového systému (apatia). Pri patologicko-anatomickom náleze základné zmeny boli na črevnej sliznici a mezentériálnych miazgových uzlinách. Vyššie uvedené zistenia sú podobné, ako udávajú Halaša a Ferenčík (1960), Ferenčík (1961), Nárožný (1965), Hašek a kol. (1965), Gdovin (1966), Gdovin a Vrzgula (1967a) a Mašek (1967).

Zvyšovanie obsahu hemoglobínu, hematokritovej hodnoty, erytrocytov a leukocyto-
v popisuje vo svojom experimente aj Ferenčík a kol. (1968). Mašek (1967) v terénnych podmienkach zisťoval menlivé hodnoty. Nevýrazné zmeny v diferenciálnom krvnom obraze, najmä

v percentuálnom zastúpení eozinofilov, pravdepodobne súvisia s krátkym časom trvania pokusu.

Z biochemických vyšetrení krvného séra vo vzťahu k pečeni boli zistené významné zmeny vo forme zvýšenej aktivity glutamovej oxáloctovej transaminázy, glutamovej pyrohroznovej transaminázy a alkalického fosfatázy. Zhodné zistenia udáva aj Ferencík a kol. (1968). Zvyšovanie pozitivity reakcií séra, zameraných na funkciu pečene, poukazuje na vážne zmeny odohrávajúce sa v organizme.

Kolísave výsledky u celkových bielkovín a bielkovinných frakcií krvného séra popisuje aj Mašek (1967), Gdovin a Vrzgula (1967b).

Nepatrné zmeny v hladine sérového vápnika u oboch skupín oviec sú zhodné s údajmi Maška (1967), Gdovina a Vrzgulu (1967a, b), Slaninu a kol. (1969). Naproti tomu zistený významný pokles u hovädzieho dobytku sa nezhoduje s výsledkami vyššie uvádzaných autorov. Stúpajúca hladina anorganického fosforu v sére hovädzieho dobytku je podobná ako ju udáva Mašek (1967), Cabada a kol. (1971). Naopak Gdovin a Vrzgula (1967a) zistili mierny pokles, Slanina a kol. (1969) neudáva podstatnejších zmien. Hladina sérového horčíka nejavila zreteľnejších rozdielov. Nemennú úroveň sérovej medi u oviec a hovädzieho dobytku popisuje aj Slanina a kol. (1969).

Porovnávať dosiahnuté výsledky alkalického rezervy a obsahu sérového železa s inými autormi je ťažko možné, pretože v dostupnej literatúre nebolo zmienky o uvedených reakciách pri podobných experimentoch.

Použité skratky

p	—	pokus
k	—	kontrola
nP	—	počet pokusných zvierat
nK	—	počet kontrolných zvierat
Hb	—	obsah hemoglobínu v g%
Hk	—	hematokritová hodnota
Er	—	počet erytrocytov v tis.
Le	—	počet leukocytov v mil.
Eo	—	eozinofily
Ba	—	bazofily
Seg	—	segmentovojadrové neutrofile
Tyč	—	paličkovo-jadrové neutrofile
Ly	—	lymfocyty
Mo	—	monocyty
Che	—	cholinesteráza v erytrocytoch
GOT	—	glutamová oxáloctová transamináza
GPT	—	glutamová pyrohroznová transamináza
Bil	—	celkový bilirubín
AF	—	alkalická fosfatáza
AR	—	alkalická rezerva
Cb	—	celkové bielkoviny
Alb	—	albumíny
Ca	—	vápnik
P	—	fosfor
Mg	—	hořčík
Cu	—	meď
Fe	—	železo

Literatúra

- BARTÍK M., HAVASSY J., 1963, Toxikózy zvierat arzénovými exhalátmi z turboelektrární a hutných závodov. Veterinárství 13 : 460—462.
- CABADAJ R., 1971, Vplyv exhalátov Východoslovenských železiární na zdravotný stav hovädzieho dobytku v prvých rokoch výroby činnosti závodu. Veterinárství.
- FERENČÍK M., 1961, Niektoré priemyselné otravy včiel a ich diagnostika. Vet. Čas. 10 : 377—382.
- FERENČÍK M., HAVELKA B., HALAŠA M., 1967, Vplyv arzénových exhalátov z ENO na niektoré zložky životného prostredia v exponovanej oblasti. Čs. hyg. 12 : 73—81.
- FERENČÍK M., KUBINEC J., MRÁZ A., HALAŠA M., HURTÍK E., TENCER V., ARVAY Š., 1968, Toxicita popolčeka z ENO pre hovädzí dobytok. Vet. Med. (Praha) 13 : 37—46.
- GDOVIN T., 1966, Niektoré výsledky štúdia vplyvu magnezitového poprašku na hovädzí dobytok a ovce. Referát na konferencii „Exhalácie a boj proti nim v košickom okrese“. Košice 21. 4.
- GDOVIN T., VRZGULA L., 1967a, Zo štúdia vplyvu magnezitového poprašku na hovädzí dobytok a ovce. Vet. Med. (Praha) 12 : 375—382.
- GDOVIN T., VRZGULA L., 1967b, Magnezitová múčka ako zdroj horčíka pre hospodárske zvieratá. Agrochémia 9 : 281—284.
- HALAŠA M., FERENČÍK M., 1960, Priemyselná fluoróza hovädzieho dobytku. Vet. Čas. 9 : 47—55.
- HAŠEK A., NÁROŽNÝ J., HLUCHÁŇ E., BLAHO E., 1965, Výskum opatrení za zrušenie fluorózy u výkrmových býčkov. Vet. Med. (Praha) 10 : 605—614.
- HEILMAYER L., PLÖTNER K., 1937, Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. G. Fischer, Jena.
- HEILMAYER L., PLÖTNER K., 1941, Kupfer und Eisen als körpereigene Wirkstoffe und ihre Bedeutung beim Krankheitsgeschehen. G. Fischer, Jena.
- HOLASEK H., FLASCHKA H., 1961, Komplexometrische und andere titrische Methoden des klinischen Laboratoriums. Springer, Wien.
- HOMOLKA J., 1956, Chemická diagnostika v detském věku. SZdN Praha.
- HOREJŠÍ J., KANDRÁČ M., MICHALEC Č., SLAVÍK K., 1957, Základy chemického vyšetřování v lékařství.
- HUMHAL K., PETRYŠIN J., 1969, Studie vlivu exhalací závodu na jeho okolí v roce 1975. Technická zpráva, Hutní projekt, Praha : 1—47.
- JANDRASSIK L., GRÖF P., 1938, cit.: CHRISTOPH J., MEYER H., 1965, Arbeitsmethoden des Laboratoriums in der Veterinärmedizin. Klinisches Laboratorium. S. Hirzel Verlag, Leipzig.
- MAŠEK J., HAIŠ K., 1964a, Negativní účinky průmyslových exhalací na skot v oblasti Ostravska. Věstník výzk. úst. zem. 11 : 161—162.
- MAŠEK J., HAIŠ K., 1964b, Výzkum toxických vlivů hlavních složek průmyslových exhalací na nejdůležitější hospodářská zvířata (skot). Dílčí závěrečná zpráva úkolu S X-3.2.4. VÚVL Brno : 1—71.
- MAŠEK J., HAIŠ K., 1965a, Preventivní opatření pro snížení negativních účinků průmyslových exhalací na užitkovost skotu. Metodiky ÚVTI 34 : 1—8.
- MAŠEK J., HAIŠ K., 1965b, Negativní účinky průmyslových exhalací na skot v oblasti Ostravska. In: RŮŽIČKA M., Problémy znečišťování ovzduší. Zborník materiálů z Sympózia o problematice exhalátů na Slovensku. Smolenice 7.—8. 11. 1963. Bratislava, SAV : 104—106.
- MAŠEK J., HAIŠ K., MEDEK T., SVOBODOVÁ R., 1965, Arzén v popílcích a mléce dojníc v oblasti Ostravska. Čs. Hyg. 10 : 497—501.
- MAŠEK J., 1967, Biochemickotoxikologická studie vlivů průmyslových exhalací na skot. Kandidátská disertační práce, VÚVL Brno.
- MICHALUS M., PORÁZIK J., 1964, Problémy ochrany ovzduší v súvislosti s výstavbou Východoslovenských železiární. Čs. Hyg. 9 : 388—394.
- NÁROŽNÝ J., 1965, Dentálna fluoróza hovädzieho dobytku. Vet. Med. (Praha) 10 : 421 až 424.
- NEUMAN V., MADĚROVÁ V., 1960, Transamináza kyseliny glutamové-pyrohroznové v krevním séru klinicky zdravých koní. Vet. Med. (Praha) 5 : 433—438.
- PAJEĐ J., BIELCKOVÁ K., 1964, Ochrana povrchových tokov prúd znečistením prevádzkou Východoslovenských železiární. Čs. Hyg. 9 : 395—398.
- ROTH Z., JOSÍFKO M., MALÝ V., TRČKA V., 1962, Statistické metody v experimentální medicíně. SZdN Praha.

- SLANINA L., GDOVIN T., CABADAJ R., 1969, Vplyv magnezitových exhalátov na bachorový biochemizmus a niektoré krvné ukazovatele u prežúvavcov v experimentálnych podmienkach. Vet. Med. (Praha) 14: 523—529.
- VRZGULA L., 1960, Komplexometrické stanovenie vápnika a horčíka v krvnom sére domácich zvierat pomocou nového indikátora — metylénovej modrej. Vet. Čas. 9: 432—438.
- WAGENHOFER E., Návod k obsluhu dvojsmernej elektroforézy na papieri. Bratislava, Statistické a evidenčné vydávateľstvo tlačív.

Došlo dne 16. 10. 1972

ЦАБАДАЙ Р., СЛАНИНА Л. (Вышшая школа ветеринарной медицины, Кошице, Чехословакия). Эксгалиционные выбросы Восточно-словацких металлургических заводов и их действие на овец и крупный рогатый скот в экспериментальных условиях. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 303—313, 1973.

Производилось клиническое, гематологическое и биохимическое обследование 16 опытных овец, сравнивающихся с 6 контрольными и 3 нетелями в возрасте два с половиной года после перорального введения порошка, взятого из агломерации и сталеплавильных цехов восточно-словацких металлургических заводов. Опыт производился в клинико-лабораторных условиях и продолжался 72 дня. В обеих опытных группах на пятый-седьмой день наблюдалась заметная диарея, которая повторялась в 7—10-дневных интервалах и сопровождалась легкой апатией и отсутствием аппетита. При патологическо-анатомическом вскрытии была обнаружена незначительная гипертрофия кишечной слизистой и кониоз мезентериальных и миазовых узлов. Лабораторные исследования свидетельствовали о достоверном повышении содержания гемоглобина, величины гематокрита, эритроцитоза, лейкоцитоза. Повышенная активность глутаминовой оксалукусной и глутаминовой пировиноградной трансминазы, а также алкалической фосфатазы. При изучении общего билирубина, щелочного резерва, общих протеинов, белковых фракций, фосфора, магния, меди и железа не наблюдалось заметных изменений. У крупного рогатого скота была установлена высокая гипокальцемия.

овцы; крупный рогатый скот; эксгалиционные выбросы; клинические проявления и лабораторное исследование

CABADAJ R., SLANINA L. (University Scholl of Veterinary Medicine, Košice, Czechoslovakia). *Exhalations of the East-Slovakian Ironworks and their Effects on Sheep and Cattle under Experimental Conditions*. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 303—313, 1973.

Clinical, hematological and biochemical examination was performed in 16 experimental sheep (with 6 controls) and in 3 heifers old two years and a half; before the examination, the dust from the agglomeration and steel work of the East-Slovakian Ironworks was applied perorally to the animals. The trial was carried out under clinical laboratory conditions for 72 days. Both experimental groups showed considerable diarrhoea 5th—7th day, and the lesion recurred in the intervals of 7—10 days. Slight apathy and inappetency were the accompanying sings. The pathological and anatomical dissection revealed slight hypertrophy of the intestinal mucuous membrane and coniosis of the mesenterial lymph nodes. The laboratory examinations showed a considerable increase of the content of hemoglobin, hematocrit value, erythrocytosis, leucocytosis. The activity of glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases and alkaline phosphatase was increased. No larger change was found in the examination of total bilirubin, alkaline reserve, total protein, protein fractions, phosphorus, magnesium, copper and iron. A significant hypocalcemia was observed in cattle.

sheep; cattle; exhalations; clinical manifestations and laboratory examination

CABADAJ R., SLANINA L. (Veterinärmedizinische Hochschule, Košice, Tschechoslowakei). *Exhalate der Ostslowakischen Eisenwerke und ihr Effekt auf Schafe und Rindvieh in Experimentalbedingungen*. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 303—313, 1973.

Bei 16 Schafen in Vergleich zu 6 Kontrollschafen und bei 3 zweieinhalbjährigen Färsen wurde eine klinische, hämatologische und biochemische Untersuchung nach

einer peroralen Verabreichung von Flugstaub aus der Agglomeration und aus der Stahlhütte der Ostslowakischen Eisenwerke durchgeführt. Der Versuch wurde in klinisch-laboratoriumsmäßigen Bedingungen durchgeführt und dauerte 72 Tage. Bei beiden Versuchsgruppen zeigte sich am fünften bis siebenten Tage eine starke Diarrhöe, die sich in 7 bis 10-tägigen Intervallen wiederholte und mit einer mäßigen Apathie und Inappetenz begleitet wurde. Bei einer pathologisch-anatomischen Sezierung wurde eine mäßige Hypertrophie der Darmschleimhaut und eine Koniose der Mesenteriallymphknoten festgestellt. Die Laboratoriumsuntersuchung ergab eine auffallende Steigerung des Hämoglobingehalts, des Hämatokritwertes, eine Erythrozytose und Leukozytose. Eine gesteigerte Aktivität der Glutamin-Oxalessig- und Glutamin-Brenztraubentransaminase als auch der alkalischen Phosphatase. Bei der Untersuchung des gesamten Bilirubins, der alkalischen Reserve, des Gesamteiweißstoffes, der Eiweißfraktionen, des Phosphors, des Magnesiums, des Kupfers und des Eisens wurde keine wesentliche Änderung festgestellt. Bei Rindvieh wurde eine signifikante Hypokalzämie festgestellt. Schafe; Rindvieh; Exhalate; klinische Äußerungen und Laboratoriumsuntersuchung

Adresa autorov:

MVDr. R. C a b a d a j, CSc., doc. MVDr. L. S l a n i n a, CSc., Vysoká škola veterinárska, 041 81 Košice

Oznamujeme čtenářům, že v čísle 6 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

budou uveřejněny následující články:

Pivko J., Blaho R.:

Vplyv skrmovania rôznych dávok močoviny na histológiu a histotopochémiu glykogénu a tukov v pečeni, obličkách jalovic a teliat od nich narodených

Frais Z.:

Bílý krevní obraz u krav primipar v předporodním období a v puerperiu

Stříž J., Čech V.:

Zvýšená salivace po založení kroužku proti hraní s jazykem jako příčina alkalózy obsahu předžaludků u skotu

Jagoš P., Hofírek B., Jurajdová J., Peroutková Z.:

Aktivita dehydrogenáz v bachorové tekutině klinicky zdravých ovcí

Čorba J., Hovorka J., Popovič Š.:

Účinnost diamphenethidu (Coribanu) u oviec prirodzene invadovaných *Fasciola hepatica*

Kubíček K.:

Baktericidní účinek Lastanoxu Q

Prokůpek K.:

Některé jevy provázející letální šok vyvolaný kulturou *Bacillus cereus*

Říha J., Hradil M.:

Metodika stanovení ekonomické efektivity veterinární služby při virové gastroenteritidě prasat

SLEDOVÁNÍ DYNAMIKY ROZVOJE VZTEKLINOVÉHO ANTIGENU V CNS MYŠÍ PO INFEKCI RŮZNÝMI KMENY POMOCÍ FLUORESCENČNÍ TECHNIKY

O. Matouch, I. Sodja

Státní veterinární ústav, Vratislavice n. Nisou
Institut hygieny a epidemiologie, Praha

MATOUCH O., SODJA I. *Sledování dynamiky rozvoje vzteklinového antigenu v CNS myši po infekci různými kmeny pomocí fluorescenční techniky.* Vet. Med. [Praha] 18 (5) : 315—332, 1973.

Přímým fluorescenčním testem byla u dvou kmenů vzteklinového viru, izolovaných z myšovitých hlodavců, sledována dynamika rozvoje antigenu a charakter inkluzí v CNS myši a porovnávána s kmenem CVS a s uličním kmenem. Virus byl aplikován do lýtkového svalu (*musculus gastrocnemius*) levé pánevní končetiny. Specifický antigen byl prokazatelný u „myších“ kmenů a CVS již za 24 hodiny v bederní míše, za 48 hodin v prodloužené míše a od čtvrtého dne po infekci ve všech částech CNS. U uličního kmene nastoupila specifická fluorescence v bederní míše pátý den a osmý den zasáhla i mozek. Fluorescenční obraz je charakterizován u kmenů z myšovitých hlodavců velkým množstvím jemných tečkovitých inkluzí typu „hvězdný prach“ s občasným výskytem větších okrouhlých nahloučení antigenní masy velikosti 4 až 7 μ . Uliční virus vykazoval zrnitější charakter a vyšší výskyt velkých kulovitých či oválných forem velikosti 6 až 12 μ . U kmene CVS byla fluorescence jemně zrnitá bez výskytu velkých okrouhlých shluků. Tvorba sérových protilátek nastoupila až v posledních dnech onemocnění a dosáhla u všech použitých kmenů jen nízkých titrů.

vzteklina; experimentální infekce; rozvoj antigenu; morfologie inkluzí; přímý imunofluorescenční test; tvorba protilátek

Z laboratorní diagnostické praxe i z řady literárních údajů [Johnson 1952, Kaplan 1969, Constantine 1966a, b, Piskareva 1958, Stirbu a kol. 1962 a další] vyplývá, že různé kmeny viru vztekliny se od sebe liší délkou inkubační doby, klinickým průběhem onemocnění, mírou patogenity, antigenními a imunogenními vlastnostmi, tvorbou či absencí Babes-Negriho tělísek a v mnoha dalších vlastnostech.

Jednou z biologických charakteristik vzteklinového viru je také tvorba specifického antigenu prokazatelného v imunofluorescenčním testu. Morfologické utváření fluoreskujících inkluzí, jejich lokalizace, četnost a uspořádání do jisté míry také charakterizují jednotlivé kmeny či skupiny kmenů, jak jsme na to již stručně upozornili u kmenů izolovaných z myšovitých hlodavců [Sodja, Matouch 1971]. Cílem předkládané práce je podrobnější studium dynamiky šíření a morfologie uspořádání fluoreskujícího antigenu v CNS myši infikovaných kmeny od divokých hlodavců a jejich porovnání s uličním kmenem izolovaným z mozku lišky a s kmenem CVS.

MATERIÁL A METODY

V pokusu bylo použito páté myši pasáže kmenů 297 BT a 598 SG, izolovaných z hraboše polního (*Microtus arvalis*), třetí myši pasáže

kmene S 114 z mozku přirozeně infikované lišky a laboratorního kmene CVS.

Skupiny 30 až 40 bílých myší (H kmen, 12 g) byly inokulovány intramuskulárně do lýtkového svalu levé pánevní končetiny. Všechna zvířata dostala dávku 1000 LD 50/0,03 ml *i. c.*, stanovenou na základě předchozí titrace příslušného kmene na myších vážících 9 g. Zvířata byla po třech zabíjena vykrvácením z retrobulbárního plexu ve 24hodinových intervalech.

Z příčných řezů bederní míchy, prodloužené míchy, mozečku, Ammonova rohu a kůry hemisfér byly zhotoveny otiskové preparáty. Fixovány byly 30 minut v acetonu při -20°C a vyšetřovány v přímém imuno-fluorescenčním testu podle Deana (1966) na přítomnost specifického antigenu. Imunní sérum pro výrobu konjugátu bylo získáno intraperitoneální imunizací křečků v týdenních intervalech třemi dávkami inaktivovaného a třemi dávkami živého CVS kmene. Konjugace FITC byla provedena ve Výzkumném ústavu imunologickém v Praze. Barvicí titr byl v poměru 1:128. Byl použit fluorescenční mikroskop ML 2, excitační filtry FS 1-2, BS-8-2, SZS 7-2, barierový filtr č. 2, lampa DRŠ 250 a zvětšení 900 $\times$. Hodnoceno bylo systémem jednoho až pěti křížků v závislosti na intenzitě a podílu fluoreskující plochy v jednotlivých vzorcích. Inkluze byly měřeny okulárovým mikrometrem Meopta.

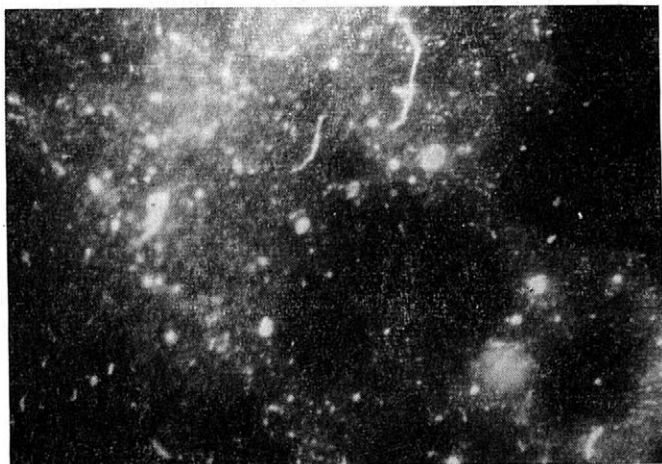
Získané vzorky sér z jednotlivých intervalů byly vyšetřovány séro-neutralizačním testem za použití 60 až 80 LD 50/0,03 ml CVS kmene podle metodiky, kterou uvádí Atanasiu (1966).

VÝSLEDKY

KMEN 297 BF a 598 SG

První den se objevují v míše jen ojediněle prachovité inkluze u kmene 297 BF. Druhý den je již výskyt nepravidelně řídce rozsetých jemných inkluzí rozšířen i na prodlouženou míchu nebo i na mozeček u kmene 297 BF. Třetí den v bederní míše pozorujeme řídce rozložené, místy nahlučené tečkovité a bodové inkluze na prachovém podkladě s občasným výskytem vláknitých forem. Obdobný obraz poskytuje i prodloužená mícha a mozeček. V *cornu ammoni* je výskyt specifických inkluzí omezen jen na několik fluoreskujících bodů. Kůra hemisfér je většinou nedotčena, nebo jen sporadicky nalézáme ojedinělé drobné tečkovité inkluze. S nástupem klinických příznaků se čtvrtý den na prachovitém pozadí vzorků bederní míchy objevují hojné bodovité inkluze až hrudkovité shluky. Patrný je výskyt fluoreskujících vláken. Obdobný charakter skýtají i ostatní části CNS. S vyšším množstvím vláken a hrudkovitých shluků nepravidelných tvarů se setkáváme v mozečku a v kůře. Pátý den ještě vzrůstá množství fluoreskujícího antigenu a zvyšuje se výskyt jemných hrudkovitých struktur a vláknitých forem zvláště v prodloužené míše, mozečku a kůře. Šestý až sedmý den dosahuje intenzita rozvoje antigenu maxima ve všech sledovaných oddílech CNS. Prachovité, tečkovité i hrudkovité inkluze jsou v hojném množství ve všech preparátech (obr. 1). Kromě Ammonova rohu je také hojný výskyt fluoreskujících vláken, někdy značně dlouhých. Ob-

čas je možné prokázat u obou kmenů ve všech částech CNS větší nahloučení fluoreskujících mas kulovitého či oválného tvaru, dosahující velikosti 4 až 7 μ (obr. 2)



1. Intenzivní fluorescence v mozkové kůře šestý den po infekci kmenem 598 CG



2. Oválná inkluze střední velikosti v prodloužené míše šestý den po infekci kmenem 298 SG

CVS kmen

Již za 24 hodiny po infekci je možné prokázat tečkovité inkluze řídce rozseté v bederní míše. Druhý den se bodovitá fluorescence rozšiřuje i na prodlouženou míchu, třetí den nacházíme prachovité a tečkovité inkluze ve všech preparátech. V mozečku a v kůře mozkové se

navíc vyskytují jemná vlákénka. V Ammonově rohu je výskyt inkluzí nejnižší. Od čtvrtého dne můžeme pozorovat u některých zvířat první klinické příznaky ve formě zjevení srsti. Intenzita výskytu specifických inkluzí se zvyšuje a dosahuje maxima pátý den; na této úrovni zůstává i šestý den (obr. 3), kdy jsou již zvířata většinou v agonii. Na všech



3. Zrnitá fluorescence v mozečku pátý den po infekci CVS kmenem

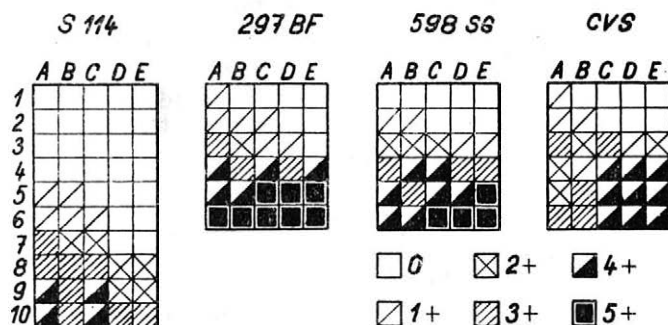
preparátech převládá obraz hojných tečkovitých až zrnkovitých inkluzí, místy s hrubšími vláknitými strukturami. V mozečku, Ammonově rohu a v kůře jsou roztroušena drobná kulovitá tělíška, vynikající na zrnitém pozadí.



4. Velká oválná inkluze v mozečku devátý den po infekci kmenem S-114

Teprve pátý den po infekci se objevují v bederní míše jednotlivé tečkovité inkluze, které se šestý den rozšiřují na prodlouženou míchu a mozeček. Od osmého dne jsou již zasaženy všechny části CNS v přibližně stejné intenzitě a častěji nacházíme větší zrnité i krátké vláknité

5. Dynamika šíření antigenu u jednotlivých kmenů [A - bederní mícha, B - prodloužená mícha, C - mozeček, D - Ammonův roh, E - kůra; intenzita fluorescence je vyjádřena 0–5 křížky]



formy inkluzí zvláště v mozečku, prodloužené míše a kůře hemisfér. Na tomto pozadí pak vynikají rozlehlá okrouhlá či oválná nahloučená fluoreskující masa v průměru 6 až 12 μ velká, někdy s poněkud ztemnělým centrem a jasnější periferií, připomínající svým tvarem a velikostí Negriho tělíska (obr. 4).

TVORBA PROTILÁTEK

Neutralizační protilátky byly prokazatelné u kmene 598 SG od pátého dne a kmene 297 BF od šestého dne po infekci. Kmen CVS vyvolal tvorbu neutralizačních protilátek již čtvrtý den, u uličního viru byly přítomny v séru až osmý den. Průběh tvorby a výšky titrů u jednotlivých kmenů demonstruje tab. I.

I. Zjištěné titry viru neutralizačních protilátek v jednotlivých dnech po infekci

Kmen \ Dny	4	5	6	7	8	9
598SG	0	1 : 10	1 : 20	1 : 20	—	—
297BF	0	0	1 : 5	1 : 20	—	—
CVS	1 : 10	1 : 10	1 : 20	—	—	—
S114	0	0	0	0	1 : 20	1 : 20

DISKUSE

Porovnáme-li navzájem charakter inkluzí u jednotlivých kmenů, je zřejmé, že „myší“ kmeny se vyznačují velmi jemnou fluorescencí typu „hvězdný prach“ s občasným výskytem větších okrouhlých inkluzí proti

hrubší, zrnitější fluorescenci s přítomností okrouhlých agregátů u uličního kmene. Co do množství inkluzí, je zorné pole u „myších“ kmenů hustě poseté, zatímco u uličního kmene je jejich rozložení mnohem řidší. CVS kmen zaujímá v tomto směru střední postavení.

Na výskyt velkých kulovitých inkluzí připomínajících velikostí Negriho tělíska v mozcích přirozeně infikovaných zvířat upozorňuje již Goldwasser a Kissling (1958). McQueen a kol. (1960) nazývá tyto inkluze „Ring forms“, popisuje jejich výskyt i u zvířat Negri negativních a uvádí velikost až 20 μ . V našem případě byly typické inkluze tohoto typu prokázány ve větší míře jen u uličního kmene. Okrouhlé shluky antigenu v preparátech z myších kmenů jsou poněkud menší a mají nižší frekvenci výskytu. U CVS okrouhlé velké inkluze nalézány nebyly.

Dynamika rozvoje antigenu prokazatelného fluorescenční technikou v CNS probíhá v souladu s inkubační dobou. U kmenů z myšovitých hlodavců, které se vyznačují krátkou inkubační dobou a rychlým průběhem onemocnění (Matouch 1971), bylo možné detekovat antigen v bederní míše již za 24 až 48 hodin, stejně jako u kmene CVS. V tomto ohledu se kmeny z hlodavců podobají kmenům „fixe“, u nichž je virový antigen po aplikaci do pánevní končetiny prokazatelný za 24 až 48 hodin v míše a za 60 hodin v mozku (Petrovic, Timm 1969, Schindler 1961).

„Myší“ kmeny vykazují větší míru invazivity do CNS než uliční kmen. V této vlastnosti je rovněž analogie s kmenem CVS, který — jak vyplývá z našich výsledků i literárních údajů (Klitselman, Mital 1968, Fischman 1969) — se vyznačuje vysokou invazitou do CNS ve srovnání s uličními kmeny. To dokazuje i průkaz antigenu uličního viru v bederní míše až pátý den po infekci. Naopak přítomnost velkých okrouhlých inkluzí odlišuje „myší“ kmeny od CVS kmene, i když ty se vyskytují v menší míře, než jsou nalézány u uličního kmene.

Pozoruhodná a diagnosticky využitelná je i okolnost, že u všech použitých kmenů je při infekci do pánevní končetiny možný fluorescenční průkaz antigenu v bederní míše ještě před objevením klinických symptomů a v době jeho přítomnosti v mozku.

Neutralizační protilátky byly prokazatelné v sérech infikovaných zvířat pouze v posledních dnech onemocnění a ve velmi nízkých titrech. Obdobné nálezy titrů 1:25 učinili již Carski a kol. (1962) u lišek, Constantine (1966) u psa skunka v sérech odebraných 24 hodiny před smrtí, stejně jako Lodmell a kol. (1969) u myší po *i. m.* aplikaci u uličního kmene i viru fixe.

Předložená studie byla dělána pouze se zaměřením na dynamiku rozvoje, šíření a morfologii inkluzí v CNS, jak se nám jeví v přímém imunofluorescenčním testu. Tedy bez ohledu na lokalizaci antigenu v buňce, či jeho šíření do ostatních orgánů mimo CNS. Vzhledem k vysoké organotropii, kterou kmeny z divoce žijících hlodavců vykazují (Matouch, Sodja 1971), bude třeba doplnit o podrobné histologické studium zahrnující postižení jednotlivých buněk a extraneurální šíření viru v organismu.

Literatura

- ATANASIU P., 1966, Quantitative assay and potency test of antirabies serum Lab. Tech. in Rabies. WHO Monogr. 23: 167—172.
- CONSTANTINE D. G., 1966a, Transmission experiments with bat rabies isolates: Responses of certain carnivora to rabies virus isolated from animals infected by non-bite route. Am. J. vet. Res. 27: 13—15.
- CONSTANTINE D. G., 1966b, Transmission experiments with bat rabies isolates: Reaction of certain carnivora, opossum, and bats to intramuscular inoculations of rabies virus isolated from free tailed bats. Am. J. vet. Res. 27: 16—19.
- DEAN D. J., 1966, The fluorescent Antibody Test. Lab. Tech. in Rabies. WHO Monogr. 23: 59—68.
- GOLDWASSER R. A., KISSLING, R. E., 1958, Fluorescent Antibody Staining of Street and Fixed Rabies Virus Antigens. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98: 219—223.
- JOHNSON H. N., 1952, Rabies. In: RIVERS T. M., Viral and Rickettsial Infections of Man. Philadelphia.
- KAPLAN M. M., 1969, Epidemiology of Rabies. Nature 221: 421—425.
- MATOUCH O., 1971, Klinický obraz vztekliny u různých laboratorních zvířat infikovaných kmeny z volně žijících malých hlodavců. Vet. Med. (Praha) 1: 29—34.
- MATOUCH O., SODJA I., 1971, Some biological properties of rabies-like viruses isolated from small wild rodents. Kongres o antropozoonózách, Štrbské pleso 5.—8. 10. 1971.
- MC QUEEN J. L., LEWIS A. L., SCHNEIDER N. J., 1960, Rabies diagnosis by fluorescent antibody. (I — Its evaluation in a public health laboratory.) Am. J. publ. Hlth 50: 1743—1752.
- PISKAREVA N. A., 1958, Antigenic Differences between Fixed and Street Strains of Rabies Virus. Acta virol. 2: 41—51.
- SODJA I., MATOUCH O., 1971, Some Biological Properties of Rabies Strains Isolated from Small Wild Rodents. J. E. M. I. 15: 209.
- STIRBU A., TOASCEN E., 1962, Étude comparative sur les caractères pathogènes des souches de virus rabique fixe Babes, Pasteur et Pitman Moore. Arch. Roum. Path. Exp. Microb. 22: 289—304.

Došlo dne 29. 7. 1972

MATOUX O., СОДЯ И. (Государственный ветеринарный институт, Вратиславице н. Нисой, Институт гигиены и эпидемиологии, Прага, Чехословакия). Изучение динамики развития антигена бешенства в ЦНС мышей после инфекции разными штаммами при помощи флуоресцентной техники. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 315—322, 1973.

При помощи непосредственного флуоресцентного теста у двух штаммов вируса бешенства из мышевидных грызунов изучалась динамика развития антигена и характер включения в ЦНС мышей и сравнивалась со штаммом CVS и уличным штаммом. Вирус вводился в *musculus gastrocnemius* левой конечности. Специфический антиген был доказуем у «мышинных» штаммов в CVS уже через 24 часа в поясничном мозгу, через 48 в продолговатом мозгу и спустя четыре дня после инфекции — во всех частях ЦНС. У уличного штамма наступила специфическая флуоресценция в поясничном мозгу на пятый день и на восьмой день также затронула головной мозг. Картина флуоресценции характеризуется у штаммов из мышевидных грызунов большим количеством мелких точкообразных включений типа «звездная пыль» с временным появлением больших округленных очагов антигенной массы размером 4—7 μ . Уличный вирус показывал более зернистый характер и более высокое появление крупных шарообразных или округленных форм размером 6—12 μ . У штамма CVS флуоресценция была мелко зернистой без появления крупных округленных очагов. Образование сывороточных антител произошло только в последних днях заболевания и достигло у всех используемых штаммов только низких титров.

бешенство; экспериментальная инфекция; развитие антигена; морфология; включение; непосредственный иммунофлуоресцентный тест; образование антител

MATOUCH O., SODJA I. [State Veterinary Institute, Bratislavice nad Nisou, Institute of Hygiene and Epidemiology, Praha Czechoslovakia]. The Use of the Fluorescence Method for the Study of the Development Dynamics of the Rabies Antigen in Mouse CNS after Injection with Various Strains. Vet. Med. (Praha) 18 (5): 315—322, 1973.

A direct fluorescence test was employed to study two strains of the rabies virus isolated from the murine rodents for the antigen development dynamics and for the character of the inclusions in mouse CNS, and to compare these strains with the CVS strain and the street strain. The virus was applied to *musculus gastrocnemius* of the left hind extremity. The specific antigen was apparent in the "mouse" strains in CVS already after 24 hours (in the lumbar part of spinal cord), and after 48 hours (in myelencephalon); from the fourth post-infection day the antigen was demonstrated in all parts of CNS. In the street strain, specific fluorescence occurred in the lumbar part of spinal cord on the fifth day, and affected the brain on the eighth day. In strains from the murine rodents, the fluorescence picture is characterized by a large number of fine dot-like inclusions of the "star dust" type with random occurrence of larger circular accumulations of the antigen mass with the size of 4–7 μ . The street virus was more granular and showed greater occurrence of large spherical or oval forms at the size of 6–12 μ . In the strain CVS the fluorescence was finely granular without larger circular accumulations. The production of serum antibodies was observed only on the last days of the disease and reached only low titres in all the strains used.

rabies; experimental infections; development of antigen; morphology of inclusions; direct immunofluorescence test; production of antibodies

MATOUCH O., SODJA I. [Staatliches Veterinärinstitut, Vratislavice n. Nisou, Institut für Hygiene und Epidemiologie, Praha, Tschechoslowakei]. *Untersuchung der Entwicklungsdynamik des Tollwutantigens in Mäusen-CNS nach der Infektion durch verschiedene Stämme mittels der Fluoreszenztechnik*. Vet. Med. [Praha] 18 (5): 315–322, 1973.

Mit Hilfe des direkten Fluoreszenztestes wurde bei zwei Stämmen des Tollwutvirus aus mausartigen Nagetieren die Entwicklungsdynamik des Antigens und der Charakter von Inklusionen im Mäusen-CNS beobachtet und mit dem CVS-Stamm und Straßenstamm verglichen. Das Virus wurde in den Wadenmuskel (*musculus gastrocnemius*) der linken Beckengliedmasse appliziert. Das spezifische Antigen war bei den „Mäusestämmen“ in CVS schon nach 24 Stunden im Lenden Rückenmark erweisbar, nach 48 Stunden im verlängerten Rückenmark und seit dem vierten Tag nach der Infektion in allen CNS-Teilen. Beim Straßenstamm ist die spezifische Fluoreszenz im Lenden Rückenmark am fünften Tag aufgetreten und am achten Tag hat sie das Gehirn erfaßt. Das Fluoreszenzbild ist bei den aus mausartigen Nagetieren gewonnenen Stämmen durch eine große Menge von feinen tupfartigen Inklusionen vom Typ „Sternenstaub“ mit zuweilen auftretenden größeren Anhäufungen der Antigenmasse mit der Größe von 4–7 μ charakterisiert. Das Straßenvirus hat einen körnigeren Charakter und häufigeres Auftreten von großen kugelartigen oder ovalen Formen mit der Größe von 6–12 μ aufgewiesen. Beim CVS-Stamm war die Fluoreszenz leicht körnig ohne Auftreten von großen rundlichen Anhäufungen. Die Bildung von Serenantikörpern ist erst in den letzten Tagen der Erkrankung eingetreten und hat bei angewandten Stämmen nur niedrige Titer erreicht.

Tollwut; experimentale Infektion; Entwicklung des Antigens; Inklusionenmorphologie; direkter Immunofluoreszenztest; Bildung der Antikörper

Adresy autorů:

MVDr. O. Matouch, Státní veterinární ústav, 463 11 Vratislavice nad Nisou,
MUDr. I. Sodja, Institut hygieny a epidemiologie, 100 00 Praha

MOŽNOSTI POUŽITÍ ULTRAZVUKU K PŘÍPRAVĚ PRECIPITAČNÍHO ANTIGENU VIRU PSEUDOMORU DRŮBEŽE

K. Černík

Bioveta, Nitra

ČERNÍK K. Možnosti použití ultrazvuku k přípravě precipitačního antigenu viru pseudomoru drůbeže. Vet. Med. (Praha) 18 (5) : 323–332, 1973.

Vliv ultrazvuku o frekvenci 9, 15 a 20 kHz, aplikovaného po dobu od 15 do 180 minut na kmeny viru pseudomoru o různé virulenci v suspenzi chorio-alantoických blan v alantoamniotických tekutinách, byl zjišťován podle změn hemaglutinační aktivity a infekčnosti viru a podle aktivity precipitinogenu. Působení ultrazvuku na virus bylo porovnáváno s vlivem mrazení při -14 a -70°C a uchovávání při $+4^{\circ}\text{C}$. Ve virové suspenzi, která nebyla ochlazována během opracování ultrazvukem, došlo k postupné inaktivaci hemaglutinační aktivity a infekčnosti viru účinkem bodového tepla. Jestliže byl virový materiál udržován při teplotě $+6$ až $+9^{\circ}\text{C}$, nedošlo během tří hodin působení ultrazvuku k významnému poklesu infekčního a hemaglutinačního titru. V precipitačním testu tvořil antigen, připravený pomocí ultrazvuku, až tři precipitační linie na rozdíl od dvou linií u antigenu mrazeného nebo uchovávaného při $+4^{\circ}\text{C}$. Z dosažených výsledků vyplývá, že ultrazvuk je vhodným prostředkem pro uvolňování viru z buněk při přípravě precipitačního antigenu. Diskutuje se specifická dvou, resp. tří precipitačních linií u viru pseudomoru.

velogenní, mezogenní a lentogenní kmeny; chorioalantoické blány kuřecích zárodků; hemaglutinační a infekční titry; zmrazování viru; bodové teplo; desintegrace viru

Ultrazvuk našel v poslední době široké uplatnění v průmyslu i v biologii, kde se používá především k rozrušování tkání i jednotlivých buněk. Působení ultrazvuku na jednotlivé buňky linie HeLa v kultuře zjišťovaly Drastichová a Pospíšilová (1969). Biologickou aktivitu viru Sendai po působení ultrazvuku zkoumal Hosaka (1970). Účinek malých laboratorních zdrojů ultrazvuku se využívá i k uvolňování viru z buněk při přípravě antigenu k precipitačnímu testu v agarovém gelu.

Cílem naší pokusné práce bylo ověřit možnosti uvolňování viru z tkání rozrušených ultrazvukem pro přípravu precipitačního antigenu a vliv ultrazvuku na některé vlastnosti viru pseudomoru drůbeže.

MATERIÁL A METODA

Virové kmeny o různé virulenci: La Sota (LS), Roakin (R), Hertfordshire (H), Italien (It) a 366/4 byly pomnoženy v alantoické dutině desetidenních kuřecích zárodků. K pokusům byly odebírány alantoamniotické tekutiny (AAT) a chorioalantoické blány (CHAM) dva dny po inokulaci kuřecích zárodků. CHAM byly mechanicky rozmělněny v třecí misce a suspedovány v AAT. Vyšetřena byla jednak suspenze

a jednak supernatant a sediment po krátkodobém odstředění suspenze při 3000 obr/min po dobu 5 minut.

Jako zdroj ultrazvuku byl použit ultrazvukový tranzistorový desintegrátor UG 100 TD o výkonu 100 W s měnitelným pracovním kmitočtem 9, 15 a 20 kHz, výrobek Výzkumného ústavu mechanizace a automatizace v Novém Městě nad Váhem. Materiál byl podroben ultrazvukové desintegraci v množství 5 ml ve zkumavkách 14×90 mm po dobu od 15 do 180 minut, jak je uvedeno u jednotlivých pokusů. V části pokusů byla zkumavka během ultrazvukového působení uložena v ledové vodní lázni, jejíž teplota byla udržována na $+6$ až $+9^{\circ}\text{C}$.

Účinnost různých frekvencí ultrazvuku byla porovnávána s působením zmrazení při -70°C v boxu se suchým ledem a -14°C v mrazícím pultě a s kontrolním vzorkem, uchovávaným do vyšetření při $+4^{\circ}\text{C}$ v chladničce.

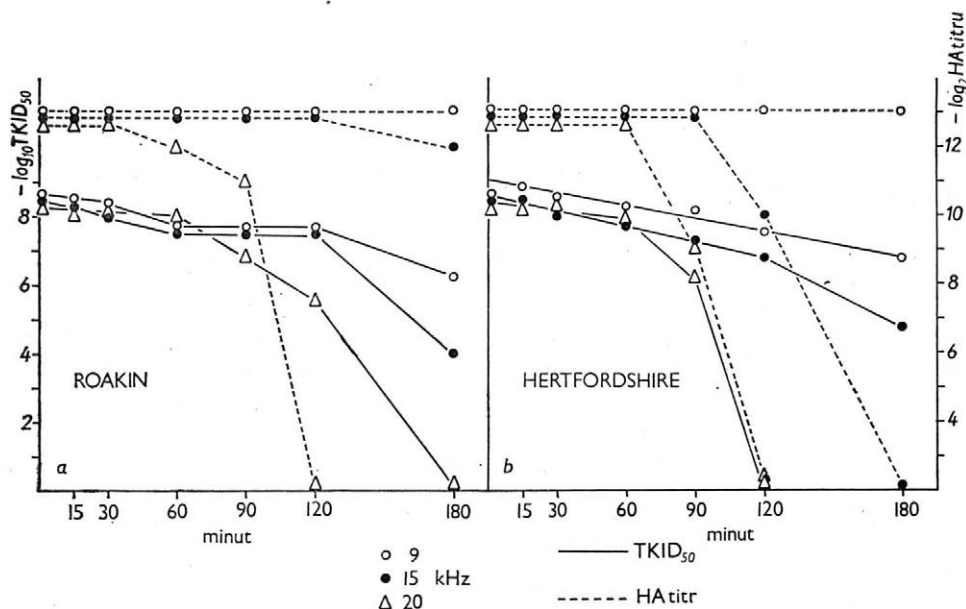
Tímto způsobem připravené antigeny byly vyšetřovány precipitačním testem v agarovém gelu dříve popsanou metodou (Černík 1969) proti odtučněnému specificky pozitivnímu séru, a to suspenze a sediment neředěné a supernatant v ředění od 1:2 do 1:16. Současně byl stanoven infekční titr viru ve zkumavkových kulturách kuřecích fibroblastů (TKID₅₀/0,1 ml) a hemaglutinační titr (HA) způsobem popsaným v předcházejících sděleních (Černík 1966).

VÝSLEDKY

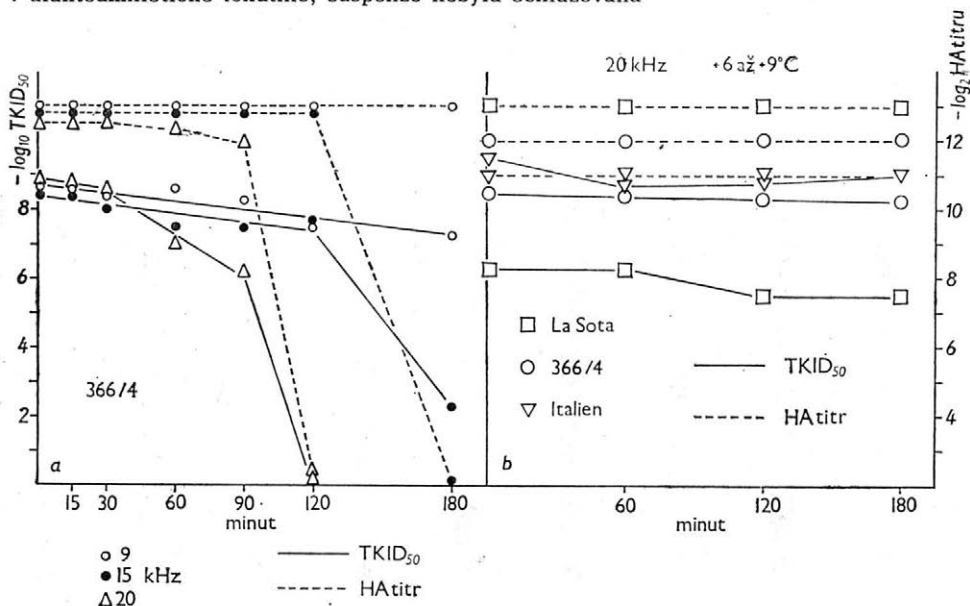
1. V prvním, předběžném pokusu byl sledován účinek působení různých frekvencí ultrazvuku na hemaglutinační a infekční titr kmenů Roakin, Hertfordshire a 366/4 v suspenzi chorioalantoických blan a alantoamniotických tekutinách po dobu od 15 do 180 minut. Zkumavky s virovým materiálem nebyly uměle ochlazovány. Dosažené výsledky jsou graficky znázorněny na obr. 1a,b; 2a.

Frekvence 9 kHz, působící po dobu 180 minut, neměla vliv na hemaglutinační aktivitu vyšetřovaných kmenů viru a jen mírný vliv na jeho infekčnost. Křivka infekčního titru (TKID₅₀) klesala ve všech případech rovnoměrně v závislosti na době působení a po 180 minutách byl zaznamenán pokles o $2,77 \log_{10}$ u kmene Roakin, o $2,1 \log_{10}$ u kmene Hertfordshire a o $1,17$ u kmene 366/4. Při kmitočtu 15 kHz se hemaglutinační aktivita udržovala na výchozí úrovni do 90 minut u kmene H a do 120 minut u kmenů R a 366/4. Po této době došlo k poklesu titru, který byl mírný u kmene R — o jeden stupeň ředění ($\log_2$), ale velmi prudký u kmenů H a 366/4, u nichž byly po 180 minutách zjišťovány nulové hodnoty. Infekční titr klesal ve všech případech zvolna do 120 minut, kdy došlo ke zlomu, který byl nejvýraznější u kmene 366/4 a nejmírnější u kmene H, u něhož předchází část křivky vykazovala největší sklon. Konečné hodnoty infekčního titru nedosáhly v žádném případě nové hodnoty, ale pohybovaly se od $2,3 (-\log_{10} \text{TKID}_{50})$ u kmene 366/4 do $4,7$ u kmene H.

Maximální rychlost poklesu hemaglutinační aktivity a infekčnosti vyšetřovaných kmenů byla zaznamenána při frekvenci 20 kHz. Hemaglutinační titry po počátečním mírném poklesu během první hodiny působení ultrazvuku dosáhly v průběhu následujících 60 minut nulových hodnot ve všech případech. Podobný byl účinek i na infekčnost



1. Vliv působení ultrazvuku různé frekvence (9, 15 a 20 kHz) po dobu 15 až 180 minut na hemaglutinační aktivitu (HA) a infekčnost (TKID₅₀/0,1 ml) kmene Roakin [a] a Hertfordshire [b] viru pseudomoru drůbeže v suspenzi chorioalantoických blan v alantoamniotické tekutině; suspenze nebyla ochlazována



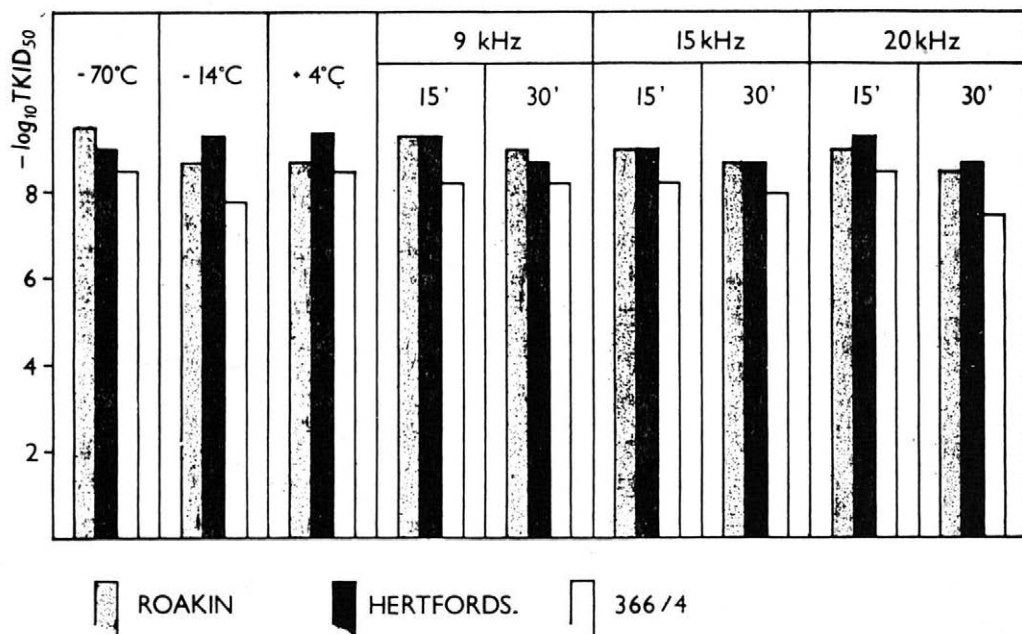
2. a) Vliv působení ultrazvuku různé frekvence (9, 15 a 20 kHz) po dobu 15 až 180 minut na hemaglutinační aktivitu a infekčnost kmene 366/4 viru pseudomoru drůbeže v suspenzi CHAM v AAT; suspenze nebyla ochlazována
b) Vliv působení ultrazvuku frekvence 20 kHz po dobu 60 až 180 minut na hemaglutinační aktivitu a infekčnost kmenů La Sota, 366/4 a Italien viru pseudomoru drůbeže v suspenzi CHAM v AAT; suspenze byla udržována po celou dobu působení ultrazvuku při teplotě + 6 až + 9 °C

viru, přičemž nulových hodnot bylo dosaženo po 120 minutách u kmenů H a 366/4 a po 180 minutách u kmene Roakin.

Obdobně byl opakován tento pokus s kmeny 366/4, Italien a La Sota při frekvenci 20 kHz, která se v předcházejícím pokusu ukázala jako neúčinnější pro inaktivaci viru, ale zkumavky byly ochlazovány uložením do ledové vodní lázně a během celé doby pokusu udržovány při teplotě +6 až +9 °C. V tomto případě nebyl zaznamenán vliv působení ultrazvuku na hemaglutinační aktivitu a infekčnost vyšetřovaných kmenů (obr. 2b) kromě bezvýznamného poklesu infekčního titru u kmene LS během druhé hodiny působení ultrazvuku. Z těchto předběžných pokusů vyplývá, že nepříznivé účinky na hemaglutinační a infekční titr viru nebyly vyvolány samotnou desintegrací viru ultrazvukem, ale tepelnou inaktivací v důsledku působení bodového tepla vznikajícího ve virové suspenzi.

2. V druhém pokusu byl sledován vliv různých frekvencí ultrazvuku (9, 15 a 20 kHz) po dobu 15 až 30 minut na virovou suspenzi kmenů R, H a 366/4, ochlazovanou ledovou lázní, a porovnáván s vlivem uchovávání téže suspenze při +4 °C po dobu jednoho týdne a zmrazení při -14 a -70 °C. Vliv byl hodnocen jednak stanovením infekčního titru viru v supernatantu, jednak precipitačním testem v agarovém gelu, k němuž byla jako antigen použita plná suspenze CHAM v AAT, sediment po centrifugaci a konečně supernatant v ředění 1:2 až 1:16.

Rozdíly v infekčním titru u jednotlivých kmenů, vyvolané různým působením na suspenzi, byly zanedbatelné a kolísaly v rozsahu 1 log₁₀ (obr. 3). Podle srovnávání průměrných hodnot všech tří vyšetřovaných



3. Vliv působení ultrazvuku různé frekvence (9, 15 a 20 kHz) po dobu 15 a 30 minut, mrazení při -70 a -14 °C a uchovávání při +4 °C na infekčnost (TKID₅₀/0,1 ml) kmenů Roakin, Hertfordshire a 366/4 viru pseudomoru drůbeže v suspenzi, která byla během působení ultrazvuku ochlazována na +6 až +9 °C

I. Precipitační reakce v agarovém gelu antigenů viru pseudomoru drůbeže, připravených různými způsoby, proti pozitivnímu séru

	— 70°	— 14°	+ 4°	9 kHz		15 kHz		20 kHz	
				15'	30'	15'	30'	15'	30'
CHAM + AAT									
Roakin	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
					++	+	++	++	++
Hertfordshire	++++	+++	+++	++	++	+	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++
	++			+	++	++	++	++	+
	++	+++	+++	+	++	++	++	++	++
366/4	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+++
SEDIMENT									
Roakin	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++
						++	++	++	++
	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+++
Hertfordshire	+++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	++	++
				+++					
	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++
366/4	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
				++	++	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++

	-7J	-14	+4	9 kHz		15 kHz		20 kHz	
				15'	30'	15'	30'	15'	30'
SUPERNATANT									
Roakin 1:2	+++	++	++	++	++ +	++	++	±	++
4	++	±	+	±	+	+	+	—	++
8	+	—	±	—	±	—	—	—	—
16	—	—	—	—	±	—	—	—	—
Hertfordshire 1:2	++	++	++	++	+++	++	+++ +	+++ ±	+++ + ++
4	±	+	+	+	+++	+	++	++	+
8	—	+	±	—	+	±	+	+	±
16	—	—	—	—	±	—	—	—	—
366/4 1:2	+	—	±	—	+	++	+++ ++	++	++
4	—	—	—	—	±	±	++ +	—	±
8	—	—	—	—	—	—	±	—	—
16	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Intenzitu reakce udává počet křížků; horní řada označuje linii bližší k jamce se sérem, dolní k jamce s antigenem.

kmenů byl infekční titr nejméně ovlivněn mrazením při -70°C a působením ultrazvuku po dobu 15 minut. Horší průměrné výsledky byly dosaženy mrazením při -14°C a třicetiminutovým působením ultrazvuku. Zatímco po 15 minutách se neprojevil účinek frekvence, po 30 minutách klesal mírně titr se zvyšujícím se kmitočtem. Vliv chladničkové teploty byl asi uprostřed průměrných hodnot.

V precipitačním testu s antigenem, připraveným mrazením z CHAM v AAT nebo ze sedimentu po centrifugaci se pravidelně zjišťovaly dvě precipitační linie stejné intenzity, popřípadě linie bližší k jamce se sérem byla silnější (tab. I). Podobný obraz byl pozorován i u antigenu uchovávaného při $+4^{\circ}\text{C}$. V intenzitě reakce nebyly zaznamenány významné rozdíly. Po opracování antigenu ultrazvukem se mezi oběma liniemi objevila třetí, všeobecně o něco slabší intenzity. Výraznost všech tří linií se stupňovala se zvyšováním frekvence a prodlužováním doby působení.

Při použití supernatantu jako antigenu byla pozorována pouze jedna precipitační linie po zmrazení antigenu nebo jeho uchovávaní při $+4^{\circ}\text{C}$, přičemž nejvýraznější linie dával antigen mrazený při -70°C a nejslabší při -14°C . Reakce se zaznamenávala do ředění 1:4 u kmenů R a H, ve vyšších ředěních (1:8) byly linie slabě patrné. Intenzita reakce po působení ultrazvuku se stupňovala obdobně jako v předcházejících případech se zvyšujícím se kmitočtem a prodlužující se dobou působení. Byly pozorovány dvě, výjimečně (kmen H, 20 kHz 30 min.) tři precipitační linie v ředění 1:2, popřípadě i 1:4. Avšak i v tomto případě ředění 1:8 dávalo jen velmi slabé nebo žádné linie.

DISKUSE

Pro porovnání účinků ultrazvuku, resp. jím vyvolaného bodového tepla na virus pseudomoru drůbeže, byly použity kmeny o různé virulenci, velogenní (366/4, Itálie), mezogenní (Roakin, Hertfordshire) i lentogenní (La Sota), ačkoliv pro přípravu precipitačního antigenu se podle Woernlea (1966) nejlépe hodí kmeny velogenní, produkující nejaktivnější precipitinogeny. Tato zkušenost však nebyla potvrzena našimi pokusy, v nichž se antigeny připravené z kmenů R a H ukázaly přinejmenším stejně aktivní v precipitačním testu, jako antigen z kmene 366/4 (tab. I). Infekčnost velogenního kmene 366/4 byla méně postižena působením bodového tepla při frekvenci 9 kHz, což je v souladu s výsledky předcházejících prací, zkoumajících termostabilitu kmenů viru pseudomoru o různé virulenci (Černík 1966, Černík, Černíková 1967). Při vyšších frekvencích, zvláště při 20 kHz, však větší odolnost vykazoval mezogenní kmen Roakin.

Rovněž výsledky sledování vlivu mrazení na infekčnost viru potvrzují dřívější pozorování (Černík, Černíková 1968), podle nichž se infekčnost lépe uchová, jestliže mrazicí teplota je -40°C a nižší, a krátkodobé skladování při $+4^{\circ}\text{C}$ je výhodnější než mrazení při teplotách kolem -14°C . Eliminují-li se při působení ultrazvuku účinky bodového tepla přiměřeným chlazením zpracovávaného materiálu, je infekčnost viru i po poměrně dlouhodobé aplikaci ultrazvuku (15 a 30 minut), kterým se podle výsledků Hosaky (1970) desin-

tegruje virová částice, narušována jen zcela nepatrně. Zvyšuje se však mírně intenzita precipitační reakce a hlavně se častěji objevuje třetí precipitační linie.

Otázka významu a specifičnosti dvou, resp. tří precipitačních linií vznikajících při použití viru pseudomoru drůbeže jako antigenu není dosud vyjasněna. Dvě precipitační linie se často zjišťují i u jiných virů — CELO (Hantschel a Schmidt 1972), HVT, ale nikdy nebyly pozorovány u viru infekční bronchitidy, i když antigeny i specifická pozitivní séra byla připravována obdobným způsobem. Obě, resp. všechny tři precipitační linie se objevují do 24 až 48 hodin po nasazení testu, a to v oblasti specifického rozsahu, tj. od středu vzdálenosti mezi jamkou se sérem a s antigenem směrem k jamce se sérem (Woernle 1966). Vedle možné nespecifičnosti nadpočetných linií, vyvolané reakcí protilátek na materiál kuřecích embryonálních tkání, se nabízí vysvětlení, že jde o samostatnou reakci jednotlivých virových antigenů odlišujících se velikostí a molekulovou vahou — nukleoproteinový antigen a antigeny obalu virionu — a působících jako precipitogeny. Tuto druhou možnost podporuje skutečnost, že třetí precipitační linie se objevuje a je výraznější po ultrazvukové desintegraci. Ačkoliv i po dlouhodobém (3 hodiny) působení ultrazvuku zůstala zachována infekčnost viru pro fibroblasty v buněčné kultuře, je možné předpokládat odštěpení obalu virionu, na který je vázána hemaglutinační a neuraminidázová aktivita viru pseudomoru, od nukleoproteinového jádra a rozdělení obalu na větší či menší fragmenty. Štěpení virionu viru Sendai na různě velké fragmenty působením ultrazvuku frekvence 20 kHz během 2 až 20 minut dokázal Hosaka (1970) sledováním hemaglutinační a hemolytické aktivity, infekčnosti a schopnosti vyvolávat fuzi buněk a interferenční aktivity částic viru Sendai, rozdělených po působení ultrazvuku centrifugací v sacharózovém gradientu. Hantschel a Schmidt (1972) dokázali, že obě precipitační linie u viru CELO (kmen B 1209), pomnoženého v alantoické tekutině kuřecích zárodků, jsou specifické a jsou vyvolány rozpustným antigenem o molekulové váze $3-5 \times 10^5$.

Pro roztlučení buněk v tkáňové kultuře a uvolnění viru je dostatečné krátkodobé působení ultrazvuku po dobu 1—2 minut, které pravděpodobně nemá významný vliv na celistvost virionu. Podle výsledků uvedených pokusů byl připraven precipitační antigen herpetického viru krůt (HVT) k sérologické diagnostice Markovy choroby. V tomto případě virový antigen, uvolněný z buněk mrazením, vytvářel jednu až dvě precipitační linie, zatímco virus, uvolněný ultrazvukem frekvence 20 kHz po dobu 1—2 minut, precipitoval za stejných podmínek ve třech až čtyřech liniích.

Supernatant po centrifugaci suspenze infikovaných CHAM v AAT není pro svůj poměrně nízký obsah antigenu vhodný pro použití v precipitačním testu. V daném pokusu byl použit jen proto, že se dá snadno a přesněji sériově naředit. Kromě toho výrazně zvýšený obsah antigenu v supernatantu po opracování ultrazvukem svědčí o uvolnění části virových částic z vazby na buňky CHAM a eventuálně i o jejich fragmentaci.

I když pro mechanické rozmělnování CHAM při přípravě suspenze se velmi dobře osvědčil laboratorní homogenizátor na malá množství

podle prof. Willemse (Ultra-Turrax), nemůže nahradit působení ultrazvuku při desintegraci buněk a uvolňování virového precipitinogenu, jehož aktivita není narušena ani dlouhodobou aplikací ultrazvuku.

Poděkování

Děkuji s. J. Suchánkové a M. Pecháčové za vzornou technickou spolupráci

Literatura

- ČERNÍK K., 1966, Vliv teploty na hemaglutinační aktivitu a infekciozitu některých kmenů NDV. I. Možnosti charakteristiky kmenů různé virulence pomocí inaktivace teplem. *Vet. Med. (Praha)* 11: 321—328.
- ČERNÍK K., 1969, Diagnostika virových chorob drůbeže precipitačním testem v agarovém gelu. *Imunoprofylaxia* 3: 26—32.
- ČERNÍK K., ČERNÍKOVÁ E., 1967, Vliv teploty na hemaglutinační aktivitu a infekciozitu některých kmenů viru Newcastlešské nemoci. II. Změny hemaglutinability a infekciozity viru během skladování při různých teplotách. *Vet. Med. (Praha)* 2: 83—92.
- ČERNÍK K., ČERNÍKOVÁ E., 1968, Vliv opakovaného mrazení a rozmrazení v různém prostředí na přežívání kmene Hertfordshire viru Newcastlešské nemoci. *Vet. Med. (Praha)* 3: 171—179.
- DRASTICHOVÁ V., POSPÍŠILOVÁ J., 1969, The influence of ultrasound on tissue culture cells. *Scripta med.*, 42: 23—27.
- HANTSCHEL H., SCHMIDT U., 1972, Some properties of CELV virus antigens in immunoprecipitation reactions. *Arch. exp. Vet. Med.* 26: 97—109.
- HOSAKA Y., 1970, Biological activities of sonically treated Sendai virus. *J. gen. Virol.* 8: 43—54.
- WOERNLE H., 1966, The use of the agar-gel diffusion technique in the identification of certain avian virus diseases. *The Veterinarian* 4: 17—28.

Došlo dne 30. 10. 1972

ЧЕРНИК К. (Биовета, Нитра, Чехословакия). Возможности использования ультразвука для приготовления преципитационного антигена вируса псевдочумы. *Vet. Med. (Praha)* 18 (5): 323—332, 1973.

Влияние ультразвука с частотой 9, 15 и 20 кгц, действующего в течение 15—180 мин. на штаммы вируса псевдочумы разной вирулентности в суспензии хориоалантоидных пленок в алантоамниотических жидкостях, определяли на основе изменений гемагглютинационной активности и инфекционности вируса, а также активности преципитиногена. Воздействие ультразвука на вирус сравнивали с влиянием морозения при -14 и -70°C и хранении при $+4^{\circ}\text{C}$. В вирусной суспензии, не охлаждаемой в процессе обработки ультразвуком, произошла постепенная инаktivация гемагглютинационной активности и инфекционности вируса под влиянием теплоты данной точки. Если вирусный материал хранили при $+6$ до $+9^{\circ}\text{C}$, то в течение 3-часового воздействия ультразвука значительного понижения инфекционного и гемагглютинационного вируса не наблюдалось. В реакции преципитации приготовленный с помощью ультразвука антиген образовал 3 преципитационные линии в отличие от замороженного или хранимого при $+4^{\circ}\text{C}$ антигена, который образует 2 линии. Результаты показывают, что ультразвук — хорошее средство освобождения вируса из клеток при приготовлении преципитационного антигена. Обсуждается специфичность двух или трех преципитационных линий вируса псевдочумы.

велогенные, мезогенные и лентогенные штаммы; хориоалантоидные пленки куриных эмбрионов; гемагглютинационный и инфекционный титры; теплота данной точки; дезинтеграция вируса

ČERNÍK K. (Bioveta, Nitra, Czechoslovakia.) *The Possibilities of the Use of Ultrasound for the Preparation of the Precipitation Antigen of Newcastle Disease Virus.* Vet. Med. (Praha) 18 (5) : 323—332, 1973.

The effect of ultrasound at the frequency of 9, 15 and 20 kHz, applied for 15—180 minutes, on the Newcastle disease virus strains of different virulence in chorioalantoic membrane suspension in alantoamniotic fluids, was studied according to the changes in hemagglutination activity and infectivity of the virus and according to the activity of precipitinogens. The effect of ultrasound on the virus was compared with the effect of freezing at -14 and -70°C and keeping at $+4^{\circ}\text{C}$. The virus suspension which was not being cooled during the ultrasound treatment gradually reduced hemagglutination activity and infectivity of the virus as a result of point heat. If the virus material was kept at the temperature from $+6$ to $+9^{\circ}\text{C}$, no significant reduction of the infection and hemagglutination titre occurred over three hours of exposure to ultrasound. In the precipitation test the antigen prepared by the ultrasound treatment produced even three precipitation lines, as distinct from the two lines in the frozen antigen or antigen kept at $+4^{\circ}\text{C}$. The results show that ultrasound is a suitable means to release the virus from cells during the production of precipitation antigen. The specificity of two, or three precipitation lines in Newcastle disease virus is being discussed.

velogenic, mesogenic and lentogenic strains; chorioalantoic membranes of chick embryos; hemagglutination and infection titres; freezing of virus; point heat; virus disintegration

ČERNÍK K. (Bioveta, Nitra, Tschechoslovakei). *Möglichkeiten der Ultraschallanwendung zur Bereitung des Präzipitationsantigens von Virus der atypischen Geflügelpest.* Vet. Med. (Praha) 18 (5) : 323—332, 1973.

Der Einfluß des in der Zeit von 15 bis 180 Minuten applizierten Ultraschalls mit der Frequenz von 9, 15 und 20 kHz auf die Virusstämme der atypischen Geflügelpest mit verschiedener Virulenz in der Suspension der chorioalantoischen Häute in alantoamniotischen Flüssigkeiten wurde anhand von Änderungen der Hämagglutinationsaktivität und Infektionsfähigkeit des Virus und anhand der Aktivität von Präzipitinogen untersucht. Die Wirkung des Ultraschalls auf das Virus wurde zu dem Tiefkühlungseinfluß bei -14 und -70°C und mit der Behaltung bei $+4^{\circ}\text{C}$ verglichen. In der Virus-suspension, die während der Ultraschallbehandlung nicht gekühlt wurde, kam allmähliche Inaktivierung der Hämagglutinationsaktivität und Infektionsfähigkeit des Virus durch Auswirkung der Punktwärme zustande. Wurde das Virusmaterial in der Temperatur von $+6$ bis $+9^{\circ}\text{C}$ behalten, kam es nicht während 3 Stunden der Ultraschallwirkung zur beträchtlichen Herabsetzung des Infektions- und Hämagglutinationstiters. Im Präzipitationstest bildete das mittels Ultraschall zubereitete Antigen an drei Präzipitationslinien zum Unterschied von zwei Linien beim tiefgekühlten oder beim $+4^{\circ}\text{C}$ behaltene Antigen. Aus den ermittelten Ergebnissen geht hervor, daß der Ultraschall ein geeignetes Mittel für die Virusfreisetzung aus den Zellen bei der Zubereitung des Präzipitationsantigens ist. Es wird die Spezifität von zwei bzw. drei Präzipitationslinien beim Virus der atypischen Geflügelpest diskutiert.

Velogene, mesogene und lentogene Stämme; chorioalantoische Häute der Küken-embryonen; Hämagglutinations- und Infektionstiters; Tiefkühlung von Viren; Punktwärme; Virendesintegration

Adresa autora:

MVDr. K. Černík, Bioveta, 949 91 Nitra

Štěpánek J., Menšík J., Pospíšil Z., Rozkošný V.: Vliv formalinu a betapropiolaktону na infekčnost a antigenicitu původce virové gastroenteritidy prasat (VGP) . . .	269
Bartoš J., Lebduška J., Habrda J.: Ftalylsulfathiazol v prevenci a léčbě průjmových onemocnění novorozených telat . . .	281
Věžník Z.: Diagnostický význam stanovení rychlosti pohybu spermií býků fotogrammetricky a testem propulsi-vity . . .	291
Cabadaj R., Slanina L.: Exhaláty Východoslovenských železiarň a ich účínok na ovce a hovädzí dobytek v experimentálnych podmienkach . . .	303
Matouch O., Sodja I.: Sledování dynamiky rozvoje vzteklinového antigenu v CNS myši po infekci různými kmeny pomocí fluorescenční techniky . . .	315
Černík K.: Možnosti použití ultrazvuku k přípravě precipitačního antigenu viru pseudomoru drůbeže . . .	323

СОДЕРЖАНИЕ

Штепанек Й., Меншик Й., Поспишил З., Розкошны В.: Влияние формалина и бетапропиолактона на инфекционность и антигенность возбудителя вирусного гастроэнтерита свиней (ВГС) . . .	279
Бартош Й., Лебдушка Й., Габрда Й.: Фталилсульфатиазол в профилактике и лечении поноса новорожденных телят . . .	289
Вежник З.: Диагностическое значение определения скорости движения сперматозоидов быков путем фотограмметрического определения и теста отталкивания . . .	301
Цабадай Р., Сланина Л.: Экспозиционные выбросы Восточно-словацких металлургических заводов и их действие на овец и крупный рогатый скот в экспериментальных условиях . . .	312
Матух О., Соджа И.: Изучение динамики развития антигена бешенства в ЦНС мышей после инфекции разными штаммами при помощи флуоресцентной техники . . .	321
Черник К.: Возможности использования ультразвука для приготовления преципитационного антигена вируса псевдомум . . .	331

CONTENTS

Štěpánek J., Menšík J., Pospíšil Z., Rozkošný V.: The influence of Formalin and β -Propiolactone on the Infectivity and Antigenicity of the Originator of the Virus Gastroenteritis of Pigs (VGP). . .	280
Bartoš J., Lebduška J., Habrda J.: Phthalylsulphathiazol in the Prevention and Therapy of Diarrhoeas in New-Born Calves . . .	289
Věžník Z.: The Diagnostic Importance of the Determination of Sperm Movement Rate by the Photogrammetric Method and by the Propulsivity Test . . .	301
Cabadaj R., Slanina L.: Exhalations of the East-Slovakian Ironworks and their Effects on Sheep and Cattle under Experimental Conditions . . .	312
Matouch O., Sodja I.: The Use of the Fluorescence Method for the Study of the Development Dynamics of the Rabies Antigen in Mouse CNS after Infection with Various Strains . . .	321
Černík K.: The Possibilities of the Use of Ultrasound for the Preparation of the Precipitation Antigen of Newcastle Disease Virus . . .	332

INHALT

Štěpánek J., Menšík J., Pospíšil Z., Rozkošný V.: Einfluß des Formalins und des Betapropiolaktons auf die Infektiosität und Antigenizität des Erregers der Virusgastroenteritis der Schweine (VGS) . . .	280
Bartoš J., Lebduška J., Habrda J.: Phthalylsulfathiazol in der Vorbeugung und Behandlung von Durchfallkrankungen der neugeborenen Kälber . . .	289
Věžník Z.: Diagnostische Bedeutung der Ermittlung der Bewegungsgeschwindigkeit von Bullspermien durch photogrammetrische Untersuchung und Propulvisitätstest . . .	301

Cabadaj R., Slanina L.: Exhalate der Ostslowakischen Eisenwerke und ihr Effekt auf Schafe und Rindvieh in Experimentalbedingungen	312
Matouch O., Sodja I.: Untersuchung der Entwicklungsdynamik des Tollwut-antigens in Mäusen-CNS nach der Infektion durch verschiedene Stämme mittels der Fluoreszenztechnik	321
Černík K.: Möglichkeiten der Ultraschallanwendung zur Bereitung des Präzipitinationsantigens von Virus der atypischen Geflügelpest	332

TABLE DES MATIÈRES

Štěpánek J., Menšík J., Pospíšil Z., Rozkošný V.: Influence de la formaline et de la bêta-propiolactone sur le caractère infectieux et l'antigénicité de l'auteur de la gastro-entérite à virus des porcs (VGP) (res. An, Al/280)	
Bartoš J., Lebduška J., Habrda J.: Phtalylsulfathiazol dans la prévention et le traitement des diarrhées des veaux nouveau-nés (res. An, Al/289)	
Věžník Z.: Importance diagnostique de la détermination de la vitesse du mouvement des spermatozoïdes des taureaux par voie photogrammétrique et par le test de propulsion (res. An, Al/301)	
Cabadaj R., Slanina L.: Exhalaisons des usines sidérurgiques de Slovaquie orientale et leur effet sur les moutons et les bovins dans les conditions expérimentales (res. An, Al/312)	
Matouch O., Sodja I.: Etude de la dynamique du développement de l'antigène rabique dans le système nerveux des souris à la suite de l'infection due aux souches diverses et provoquée par la technique de fluorescence (res. An, Al/321)	
Černík K.: Possibilités d'utilisation de l'ultra-son à la préparation de l'antigène du virus de la pseudo-peste aviaire (res. An, Al/332)	