VĚDECKÝ ČASOPIS

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

7

ROČNÍK 18 (XLVI)
PRAHA
ČERVENEC 1973
CENA 10 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ

ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Řídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král (předseda), prof. MVDr. Koloman Boďa, DrSc., doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr. Jaroslav Dražan, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., MVDr. Miloš Halaša, CSc., prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc., doc. MVDr. Jozef Hrušovský, 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 studie, rozbory a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav vědeckotechnických informací. Vychází měsíčně. Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné Kčs 120,—.

Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзоры, анализы и научные статьи о разрешенных задачах по научному 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. Published by the Institute of Scientific and Technical Information. Issued monthly. Editoral office 120 56 Prague 2, Slezská 7.

Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍNA veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Abhandlungen über die gelösten Forschungsaufgaben auf dem Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben von Institut für wissenschaftlich-technische Informationen. Erscheint monatlich. Redaktion 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 médicine vétérinaire. Publie par l'Institut des Informations Scientifiques et Techniques. Paraît une fois par mois. Rédaction 120 56 Prague 2, Slezská 7.

7

ANESTÉZIE HYDROCHLORIDEM KETAMINU* U PSŮ

E. Král, L. Němeček, J. Pavlica, V. Roztočil

Vysoká škola veterinární, katedra reprodukce hospodářských zvířat a chirurgie, Brno

Věnováno k padesátinám prof. MVDr. J. Šutty, CSc.

KRÁL E., NĚMEČEK L., PAVLICA J., ROZTOČIL V. *Anestézie hydrochloridem ketaminu u psů.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 397-408, 1973.

Chlorpromazin v dávce 3 mg/kg ž. v. a hydrochlorid ketaminu v dávce 15 mg/kg ž. v. podané *i. m.* vedou k dostatečné sedaci a analgezii umožňující běžné operativní zákroky. Kombinace způsobuje výrazné snížení tělesné teploty, dechového a minutového dechového objemu. Elektrokardiograficky byly zjišťovány arytmie z poruch vodivosti a extrasystolické arytmie. Elektroencefalografické nálezy prokázaly iritační grafoelementy. Hydrochlorid ketaminu s chlorpromazinem snižuje hodnoty hemoglobinu, hematokritu, celkových bílkovin a hladinu draslíku. Naopak zvyšuje hladinu glukózy a hodnoty transaminázy kyseliny glutamooxaloctové. Krevní elementy sedimentace, hladina Na a GPT nebyly ovlivněny.

celkové znecitlivění; chlorpromazin; ketamin hydrochlorid; puls; dech; teplota; spirometrie; EKG; EEG; krev; bílkoviny; glukóza; transaminázy; pes

Sledujeme-li současný rozvoj anesteziologie, vidíme, že inhalační anastézii, která si již po leta udržuje primát, úspěšně začíná konkurovat anestézie injekční. Je to díky tomu, že se v posledních letech objevila na trhu injekční anestetika s velmi silným analgetickým účinkem a přitom velmi málo toxická. V humánní medicíně se v tomto směru velmi dobře osvědčil již Fentanyl v kombinaci s Dehydrobenzperidolem a v poslední době pak ketamin hydrochlorid. O jeho farmakologických vlastnostech a možnostech využití ve veterinární medicíně, speciálně u koček, jsme referovali na odborném semináři v Brně (Král a kol. 1970) a v časopise Veterinární medicína (Král a kol. 1972b). O použití ketaminu u koček podávají zprávu dále Commons (1970), Dürr a Kraft (1971) a Beck a kol. (1971). V poslední době se ukazuje, že ketamin bude možno s úspěchem užít i u jiných zvířat. Kittle (1971) doporučuje Ketamin HCl u holubů, Mandelker (1972) u papoušků a Beck s Dresnerem (1972) vyzkoušeli Ketalar u 615 primátů. Jako perspektivní se jeví Ketamin HCl podle zpráv Humphreye (1971), Kaplana (1972) i podle našich zkušeností (Král a kol. 1972a) u psů.

Humphrey (1971) doporučuje Ketaset (Bristol Lab.) a Vetalar (Parke-Davis) aplikovat po premedikaci neuroleptiky, která usnadňují a prohlubují

*) Ketalar, Parke-Davis Comp., London

anestézii a po premedikaci atropinem, který potlačuje silnou salivaci. Doporučuje 20 mg/kg ž. v. *i. m.* nebo poloviční dávku nitrožilně. Nitrožilná aplikace, zvláště je-li rychlejší, vyvolává přechodnou depresi dechu.

Kaplan (1972) doporučuje Ketaset (Bristol Lab.) pro krátkodobé jednoduché zákroky samotný, pro náročné operace s premedikací atropinem a neuroleptikem a v kombinaci s ultrakrátce působícím barbiturátem. Všeobecně pro psy, vážící méně než 10 kg, potřebovali 20 mg/kg, pro větší psy 10 až 15 mg/kg. Nepříznivým doprovodným jevem je silná salivace, bolestivost v místě injekce a hlavně tonicko-klonické křeče, které se vyskytly v 3,4 % případů. Ačkoliv ketamin rychle přechází placentární bariérou, bylo 11 štěňat u tří císařských řezů vyjmuto bez komplikace.

Ve všech citovaných případech byl ketamin zkoušen jen klinicky. Cílem naší práce bylo zjistit, jak ketamin působí na životně důležité funkce.

METODY

Užili jsme Ketalaru firmy Parke-Davis (ketamin hydrochlorid, 2-(0-chlorophenyl)-2-(methylamino)cyclohexanone hydrochlorid), který se dodává v 1% a 5% roztoku. Dáváme přednost 5% roztoku, v němž v 1 ml je 50 mg ketaminové báze.

Pokusy jsme dělali na 12 pokusných psech, klinicky zdravých, v dobrém výživném stavu, starých od šesti měsíců do šesti let.

Na základě literárních údajů a z ekonomických důvodů jsme se rozhodli pro kombinaci Ketalaru s chlorpromazinem (Plegomazin — Egyesült Gyóyozenes tapszergyár Budapest).

Ve dvou orientačních pokusech jsme zvolili dávku 2 mg chlorpromazinu na kg ž. v. *i. m.* a 10 mg ketamin hydrochloridu na kg ž. v., rovněž *i. m.* Poněvadž účinek byl nedostatečný, použili jsme ve vlastních pokusech na deseti psech 3 mg chlorpromazinu na kg ž. v. *i. m.* a za 15 minut 15 mg ketamin hydrochloridu na kg ž. v. *i. m.* Po 24hodinové hladovce byly zaznamenány: frekvence tepu a dechu, dechový objem, minutový dechový objem a rektální teplota. Potom byly sejmuty EKG a EEG záznamy a odebrána krev pro zjištění hodnot hemoglobinu, hematokritu, počtu erytrocytů, leukocytů a diferenciálního počtu, sedimentace, bílkoviny krevního séra, glukózy, hladiny Na a K, transamináz GOT a GPT.

Během pokusu byl sledován nástup znecitlivění, stupeň analgezie, kvalita víčkového, rohovkového a šlapkového reflexu, doba trvání znecitlivění, výskyt vedlejších příznaků a probouzení.

Trias, dechové objemy a elektrokardiogram byly sledovány za 10, 20, 30, 60 minut a za 24 hodiny od podání Ketalaru. Elektroencefalografický záznam byl pořízen po podání chlorpromazinu, potom po podání ketaminu průběžně až do návratu předaplikačních hodnot. Krevní vzorky byly odebírány za 30, 60 minut, za 3 a 24 hodiny a pro sledování hodnot transamináz ještě za 48, 72 a 96 hodin po aplikaci Ketalaru.

Frekvence dechu, dechový objem a minutový dechový objem byl určován ventilometrem MEDI-BZ 03 .

EKG záznamy byly získány přímopíšícím jednokanálovým elektrokardiografem. Ke snímání akčních srdečních potenciálů jsme zvolili jehlové elektrody, které jsme umísťovali do podkoží dorsálního okraje proximální části předloktí pravé a levé hrudní končetiny a do podkoží dorsolaterálního okraje proximální části bérce levé pánevní končetiny. Po zapojení příslušných kabelů elektrokardiografu jsme registrovali tři standardní končetinové bipolární svody. Při roz-

boru a zhodnocení získaných zápisů jsme vycházeli z údajů Herlese (1954), Ettingera a Sutera (1970) a Schrödera a Südhofa (1971).

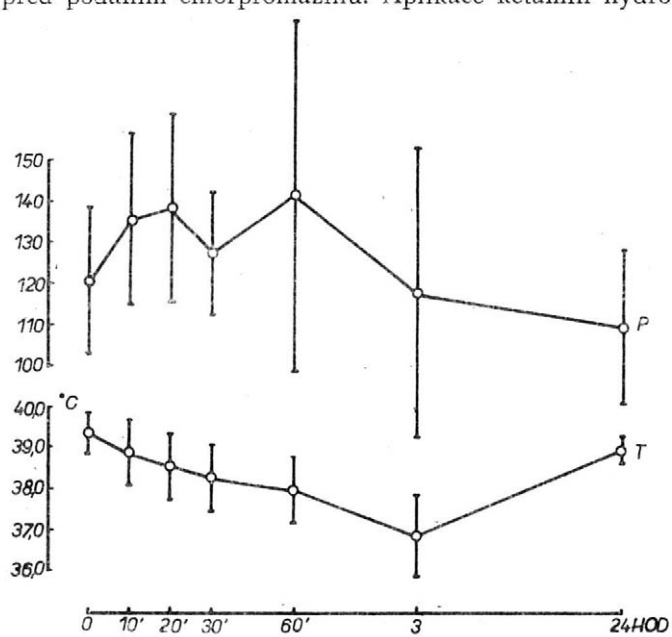
K elektroencefalografickému vyšetření pěti psů jsme použili čtyřkanálový sovětský elektroencefalograf 4 EEG-1 a čtyři kovové elektrody lepené pastou na kůži zbavenou srsti. Užito bylo bipolárního zapojení longitudinálního — pravá frontální — pravá okcipitální (F-O dx.), levá frontální — levá okcipitální (F-O sin.) a zapojení transverzálního — pravá okcipitální — levá okcipitální (O-O).

Frontální elektrody byly umístěny napravo a nalevo od palpovatelného spojení obou částí *crista frontalis externa* v jedné čtvrtině vzdálenosti tohoto spojení od příslušného *arcus zygomaticus*. Okcipitální elektrody byly umístěny v úrovni *tuberositas lateralis lineae nuchalis dorsalis* ve stejné sagitální linii s elektrodami frontálními. K uzemění sloužily dvě jehlové elektrody zavedené pod kůži po obou stranách *dorsum nasi*.

Hodnota hemoglobinu byla stanovena Drapkinovou metodou (Hořejší a kol. 1957). Ke stanovení hladiny glukózy jsme použili metodu navrženou Jíchou a Kulhánkem, uvedenou ve firemním návodu, přiloženém k soupravě chemikálií fy. Lachema, Brno. Transaminázy kyseliny glutamo-oxaloctové (GOT) a kyseliny glutamo-pyrohroznové (GPT) byly zjišťovány Reitman-Frankelovou metodou, uvedenou rovněž ve firemním návodu, přiloženém k soupravě chemikálií. Hladiny Na a K byly určovány v krevním séru plamenovou fotometrií. Výsledky byly zpracovány a statisticky vyhodnoceny *t*-testem (Homolka 1969a).

VÝSLEDKY

Chlorpromazin v dávce 3 mg/kg ž. v. vedl k velmi slabé sedaci. Zvířata, fixovaná v boční poloze pro aplikaci ketaminu, reagovala přibližně stejnými obrannými pohyby jako před podáním chlorpromazinu. Aplikace ketamin hydro-



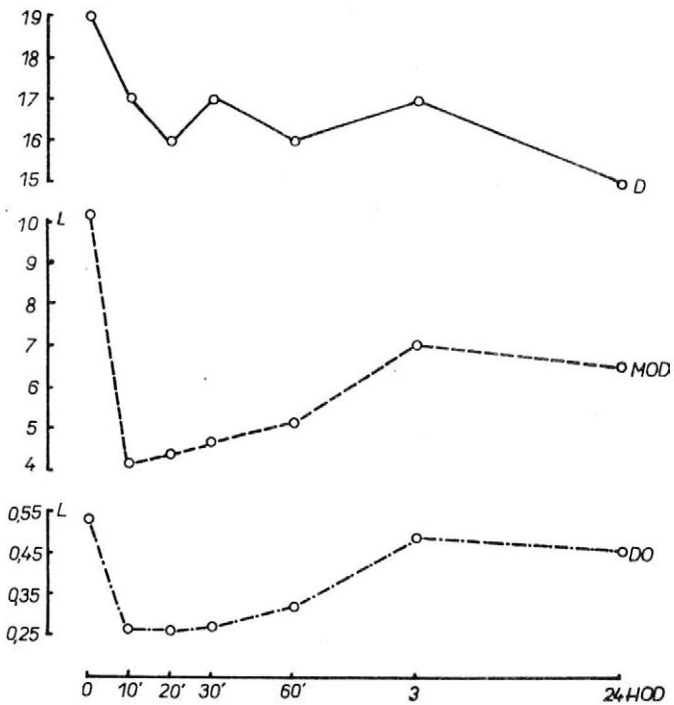
1. Hodnoty pulsu (P) a teploty (T) v průběhu znecitlivění Ketalarem s premedikací chlorpromazinu

chloridu do plantární stehenní svaloviny byla u většiny psů bolestivá. Za 3 až 5 minut nastupovala ataxie a od 5 až 10 minut sedace a analgezie. V průběhu nástupu znecitlivění se u tří psů vyskytly krátkodobé opakované záškuby kosterní svaloviny, zvláště na končetinách. U těchto psů přistoupila navíc mikce a zvýšená salivace. V jednom případě došlo k abnormálnímu chvění celého těla zvířete a trvalo po celou dobu znecitlivění i po dobu probouzení. Ve všech případech nastoupila dostatečně hluboká analgezie, kdy citlivost na čenichu, ušním boltci, v krajině anu i na periostu byla zcela vymizelá. Doba trvání analgezie se pohybovala v jednotlivých případech od 20 do 70 minut. Během této doby ležela zvířata v boční poloze. Víčkový a rohovkový reflex byl zachován, šlapkový reflex byl vymizelý. Potom docházelo k probuzení zvířat — u tří zvířat bylo spojeno opět s vedlejšími krátce trvajícími třesy, svalovými záškuby či spasmy hrudních končetin. V tomto stadiu probouzení zvířata ležela stále v boční poloze, občas zvedala hlavu či pohybovala hrudními končetinami. Zvířata se snažila vstát za jednu až jednu a půl hodiny. Po třech hodinách byla u nich chůze ještě dosti nekoordinovaná.

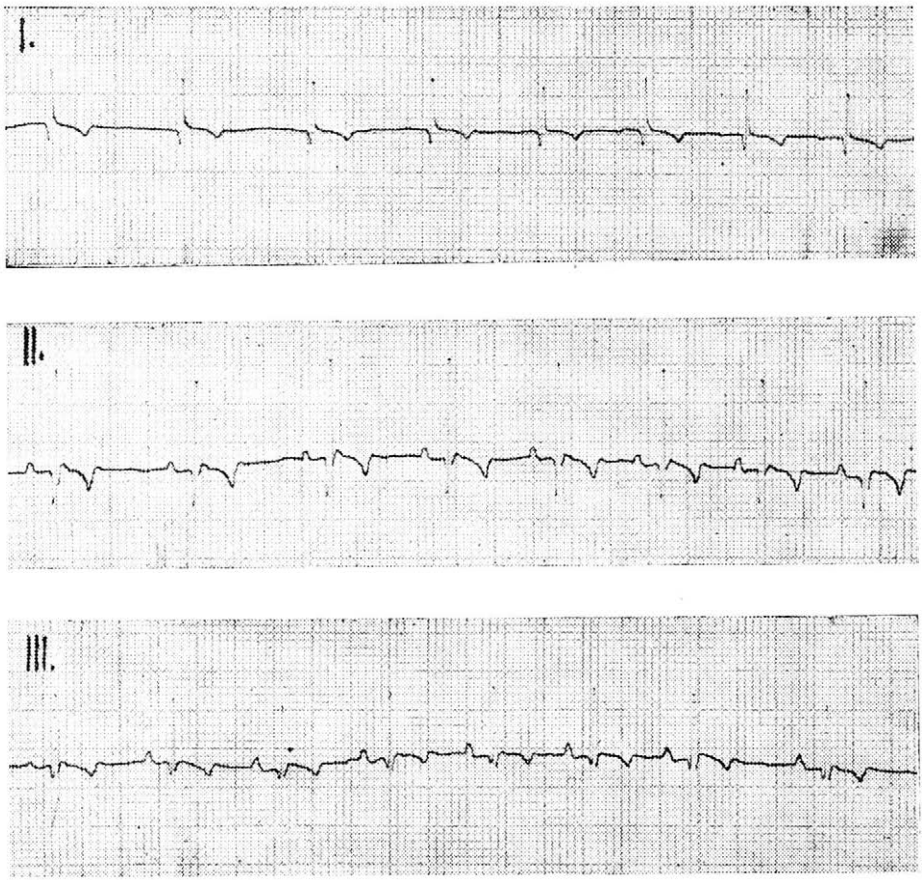
Chlorpromazin s ketaminem výrazně snižují tělesnou teplotu zvířete (obr. 1). Již 10 minut po aplikaci ketaminu je pokles tělesné teploty statisticky významný, za tři hodiny klesá teplota až o 2,5 °C a ještě za 24 hodiny bylo zaznamenáno průměrné snížení tělesné teploty o 0,4 °C.

Puls v jednotlivých měřeních značně kolísá. Nejvyšší hodnoty, které však nejsou statisticky význačné, byly zjištěny za 60 minut po aplikaci (obr. 1).

Frekvence dechová (obr. 2) nebyla výrazně ovlivněna. Výrazně změněny však byly jak dechový, tak minutový dechový objem. Již v měření za 10 minut od podání je pokles dechového objemu vysoce statisticky významný a tato významnost trvá ještě i v měření za 60 minut. Za tři hodiny zaznamenáno průměrné snížení tělesné teploty o 0,4 °C.



2. Hodnoty frekvence dechové (D), dechového objemu (DO) a minutového dechového objemu (MDO) v průběhu znecitlivění Ketalarem

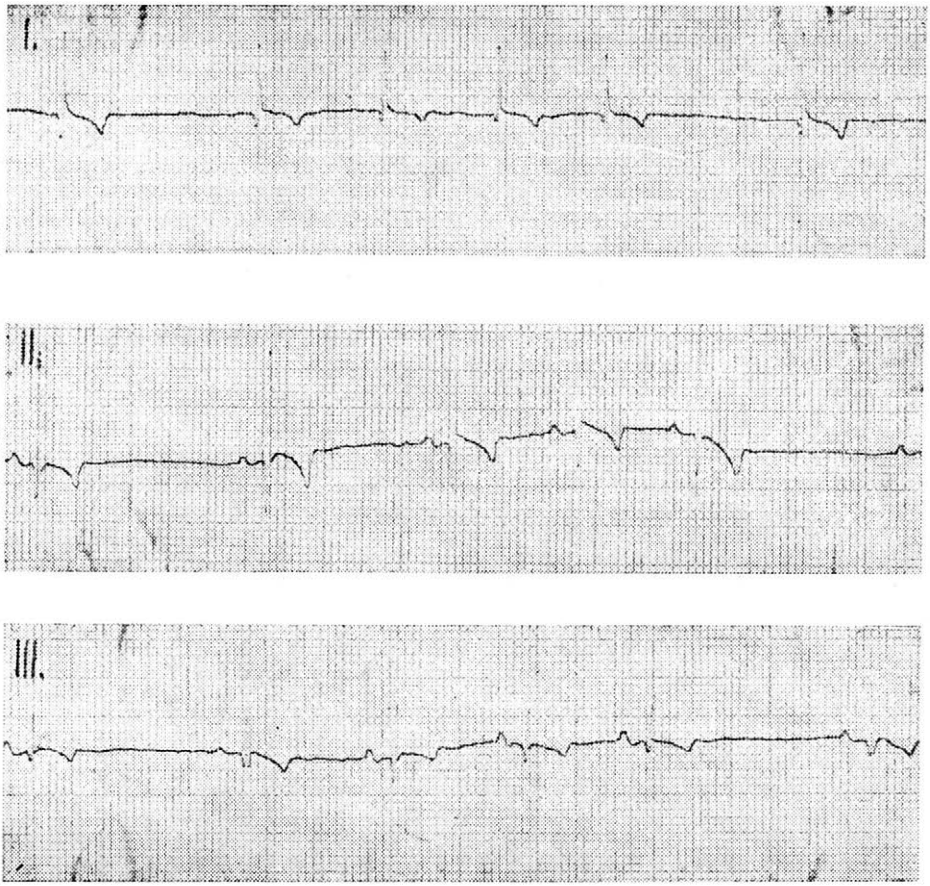


3. EKG z bipolárních končetinových svodů psa před pokusem

naný pokles není již statisticky významný. Téměř stejný je i průběh minutového dechového objemu.

Při porovnání E K G n á l e z ů v průběhu a po anestézii chlorpromazinem a ketaminem HCl s výchozími záznamy (obr. 3, 4) byly zjišťovány změny v sinusovém rytmu, a sice jeho kolísání, které nebylo závislé na respiraci. Tyto sinusové arytmie jsme pozorovali u jednoho psa v měření za 30 minut od podání ketaminu a byly i v záznamu za 24 hodiny. U dalších tří psů se objevilo zřetelné sinusové kolísání tvorby vzruchů až v měření za tři hodiny. U jednoho z těchto případů trvalo i v měření za 24 hodiny, u dalšího jsme pak registrovali za 24 hodiny atrio-ventrikulární blokádu typu Wenckebachovy periody. U téhož psa jsme zaznamenali v měření za 10 a 20 minut ojedinělé komorové extrasystoly. Kromě těchto poruch sinusového rytmu, arytmií z poruch vodivosti a extrasystolických arytmií jsme pozorovali dislokaci S-T segmentu, změnu tvaru a polarity vlny T a odchylky v amplitudových hodnotách vlny P a kmitů QRS skupiny.

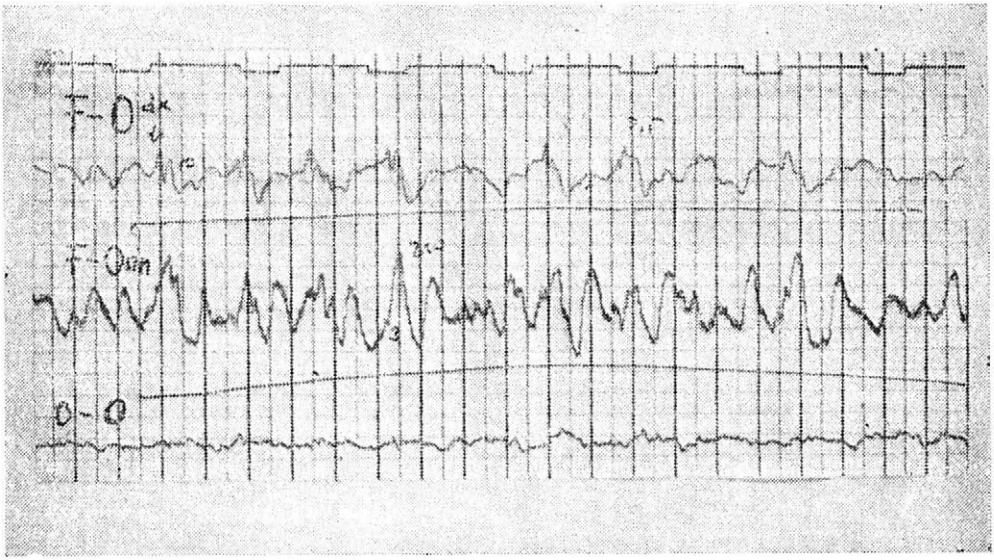
V ý s l e d k y E E G v y š e t ř e n í: Vzhledem k různému charakteru elektroencefalografických nálezů pokládáme za vhodné uvést stručně individuální popisy.



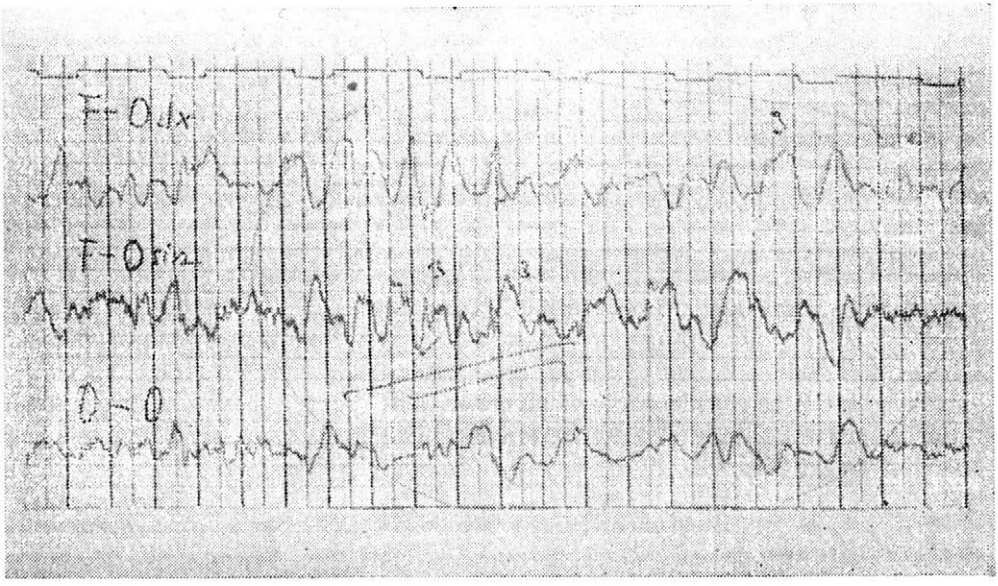
4. EKG u téhož psa za 10 minut po aplikaci Ketalaru s premedikací chlorpromazinu — výrazná sinusová arytmie

P e s č. 9: Za 10 minut po podání Plegomazinu je smíšený vlnový obraz s vlnami 2 a 3 c. s. i skupinami 9 až 11 c. s. i 6 c. s. 7,5 min po podání Ketalaru v podélných zapojeních převažují pomalé vlny 2 a 3 c. s., v levých svodech vysoká aktivita v pásmu 4 a 3 c. s. Navíc jsou vlevo vysoké strmé vlny 3 c. s. a vpravo nedokreslené komplexy ostrá vlna + pomalá vlna (obr. 5). Až do 30 minut se obraz podstatněji nemění, zůstává smíšený vlnový obraz se strmými vlnami v pásmu 4 a 3 a 5 c. s., mající protifázi k levému okcipitálnímu poli. Po 35. minutě byla zjištěna předaplikační mozková aktivita. Do smíšeného vlnového obrazu jsou tedy přimíseny strmé grafoelementy i nedokreslené komplexy ostrá vlna — pomalá vlna s predilekcí v levých, spíše zadních polích.

P e s č. 10: Po podání Plegomazinu za 5 až 10 minut je smíšený vlnový obraz. Za 5 minut po podání Ketalaru převažují pomalé vlny 2 a 3 c. s., ale v levém podélném svodu jsou jednotlivé ostré vlny 8 c. s. a nepravidelné komplexy ostrá vlna — pomalá vlna 2 c. s. Za 10 minut po podání Ketalaru (obr. 6) je epizodická křivka se střídáním rychlejších a pomalejších úseků, ale mezi pomalými vlnami se vyskytl i komplex hrot — vlna 3 c. s. na levé straně. Analogický ráz křivky je i za 20 minut po Ketalaru. Po 40 minutách jsou v levém zapojení rytmické vlny 3 a 5 c. s. a teprve po 60 minutách je návrat předapli-



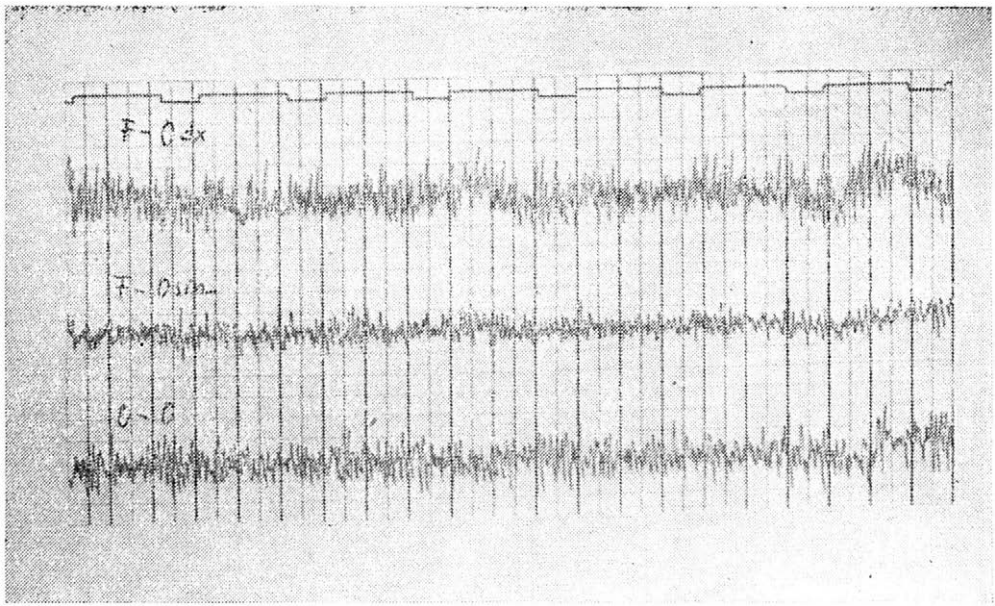
5. EEG psa č. 9 — 1½ minuty po aplikaci Ketalaru



6. EEG psa č. 10 — 10 minut po aplikaci Ketalaru

kační aktivity. I v obraze narkózy u tohoto psa jsou patrny patologické iritační místní grafoelementy.

Pes č. 11: Po Plegomazinu se vysoká beta aktivita téměř nemění. Po 10 minutách se pod ni podkládají pomalé vlny. Velmi brzy po podání Ketalaru (2½ min) jsou po celé ploše velmi vysoké vlny a hroty 12 až 15 c. s. a komplexy vysoké — strmé vlny 7 c. s. s hrotem. I po 5 minutách trvá tato aktivita. Je poněkud více vln 3 až 5 c. s. s ostrými vlnami 9 až 10 c. s., které jsou orien-



7. EEG psa č. 12 — 5 minut po aplikaci Ketalaru

továny pozitivně i negativně. Za 15 minut po podání Ketalaru je frontookcipitálně vpravo a interokcipitálně pravidelný vlnový obraz z ostrých vln 9 až 11 c. s. a komplexů ostrá vlna — pomalá vlna 5 až 6 c. s. V té době dosud výrazný celotělový třes dosáhl maxima. Za 20 minut po podání Ketalaru je smíšený vlnový obraz a za 25 minut po aplikaci Ketalaru je návrat (předaplikační) beta aktivity.

V souvislosti se svalovým třesem došlo k hromadění komplexů ostrých a pomalých vln i hrotů, a to spíše ložiskově s maximem k pravé okcipitální elektrodě. I když nelze vyloučit arteficiální (extracerebrální) původ těchto grafoelementů, jejich fokální zdůraznění vnucuje podezření na možnou aktivaci iritačního mozkového ložiska.

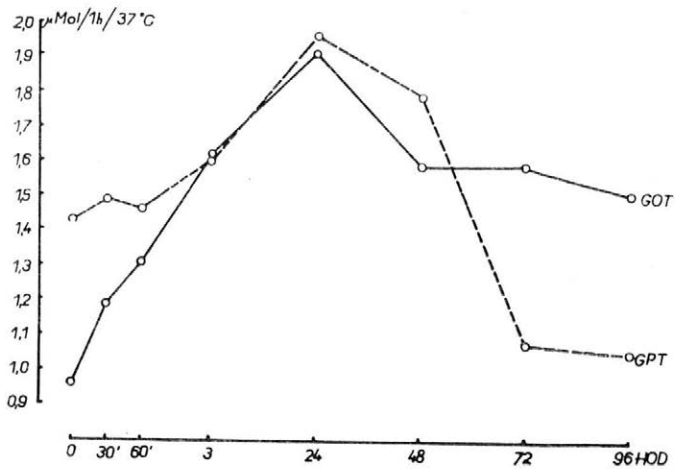
P e s č. 12 a 13 si podržuje po celou dobu pokusu beta aktivitu po celé ploše; amplituda sice kolísá, ale nevymizí. Podložené jsou občasné vlny kolem 2 c. s., související s pohyby bulbů (obr. 7).

I. Průměrné hodnoty bílkovin, elektrolytů, glukózy a krevních

		CB g%	Elektrolyty mE/l		Glukóza mg %
			Mg	K	
Před aplikací		7,04 ± 0,59	144 ± 14	4,5 ± 0,4	87 ± 13
Po aplikaci	30′	6,56 ± 0,48	141 ± 10	4,0 ± 0,7	104 ± 21
	1 h	6,43 ± 0,46	142 ± 8	3,8 ± 0,7	110 ± 31
	3 h	6,45 ± 0,41	140 ± 2	3,7 ± 0,3	138 ± 45
	24 h	6,71 ± 0,38	144 ± 9	4,0 ± 0,6	102 ± 14

Vysoká beta aktivita tedy nevymizela. Předpokládáme o ní, že je myogramem svalů kalvy.

Elektroencefalograficky u dvou šestiměsíčních štěňat (č. 9 a 10) se do dobře rozvinutého EEG doprovodu narkózy promítají iritační grafoelementy, ale EEG doprovod narkózy je patrný zřetelně. Naproti tomu u dospělých psů č. 12 a 13 nejsou EEG změny jiné než kolísání amplitudy beta aktivity a záznam pohybu bulbů. Je tedy disociace mezi klinickým obrazem narkózy a záznamem EEG. Vnucuje se otázka, zda štěňata, protože ještě nepoužívají v dostatečné míře sluchové telerecepce ve spánku, neaktivují tolik svaly hlavy jako dospělí psi. U dospělých by potom tato svalová aktivita mohla maskovat cerebrální potenciály.



8. Hodnoty GOT a GPT v průběhu znecitlivění Ketálarem

Interpretační rozpaky vzbuzuje pes č. 11, u něhož v uváděcí fázi narkózy až do 15 minut po aplikaci Ketalaru je abnormní místně zdůrazněná vysoká ostrá a hrotnatá aktivita, připomínající specifickou aktivitu iritačně ve spojení s extrémním celotělovým třesem.

Chlorpromazin s hydrochloridem ketaminu významně ovlivňují i hodnoty hemoglobinu a hematokritu (tab. I). Zaznamenané poklesy byly statisticky vysoce významné do 3 hodin po aplikaci. V měření za 24 hodiny se hodnoty přibližují k výchozím hodnotám.

elementů v průběhu narkózy ketamin hydrochloridem

Hemoglobin g %	Hematokrit %	Erytrocyty mil.	Leukocyty tis.	Leukogram v %				
				Se	Ty	Ly	Mo	Eo
16,5 ± 1,5	65,5 ± 6,1	7,29	8,4	66	2	22	4	6
13,9 ± 1,3	53,4 ± 9,0	6,32	8,3	72	2	16	4	6
13,9 ± 1,5	52,3 ± 10,6	6,16	8,5	73	2	16	4	6
13,8 ± 2,0	51,7 ± 10,5	6,05	10,7	75	1	13	5	5
15,4 ± 2,2	55,6 ± 10,4	6,71	10,6	73	1	16	5	5

V krevních elementech (tab. I) jsme nezaznamenali podstatnějších změn, stejně jako u hodnot sedimentace.

Vliv na celkové bílkoviny (tab. I) se projevil jejich snížením, a to statisticky významným, při měření za 1 a 3 hodiny po aplikaci. Naproti tomu u glukózy (tab. I) došlo k významnému zvýšení již za 30 minut od aplikace a toto zvýšení je významné ještě za 24 hodiny.

Zatímco hladina Na nebyla dotčena, došlo u hladiny K k vysoce významnému snížení již za 30 minut po podání a ještě za 24 hodiny bylo toto snížení statisticky významné (tab. I).

Ze sledovaných transamináz byla ovlivněna pouze transamináza kyseliny glutamo-oxaloctové, a to v měření za 3 hodiny od aplikace, kdy došlo k jejímu významnému zvýšení; toto zvýšení trvá v celém dalším průběhu vyšetření (obr. 8).

DISKUSE

Dávky, ke kterým jsme v orientačním pokuse dospěli, odpovídají údajům Kaplana (1972); Humphrey (1971) použil dávek poněkud vyšších. Jako tito autoři, doporučujeme pro vyvolání účinnější anestézie premedikaci ataraktiky.

Souhlasně s literárními údaji jsme zjistili bolestivost při aplikaci anestetika do svaloviny a při nástupu anestézie krátkodobé záškuby kosterní svaloviny, zvýšenou salivaci a mikci. Naše výsledky pokud se týče teploty, pulsu a dechu nemůžeme konfrontovat, poněvadž jak práce Kaplana (1972), tak Humphreye (1971) trias neuvádějí. Výrazný pokles dechového a minutového dechového objemu je nutné brát v úvahu při kombinaci s léky, které mají vliv na dech.

Z malého počtu našich případů nemůžeme hodnotit tento způsob anestézie z hlediska klinického použití. Z řady rušivých příznaků, které se v našich pokusech vyskytly, vyplývá, že tento způsob anestézie není ideální pro běžnou klinickou praxi.

Pokud se týká elektrokardiografických záznamů, sinusové arytmie, které jsme zaznamenali nezávisle na respiraci, jsou připisovány zvýšenému tonu vagu (Herles 1954, Schröder a Südhof 1971). Domníváme se, že v našich pokusech je tento zvýšený tonus vagu vyvolán ketaminem a není paralyzován chlorpromazinem. Tyto dočasné arytmie a další zjištěné odchylky v EKG budou dále podmiňovány hypotermií, hypoxií, neurovegetativní distonií a metabolickými změnami, jak udávají Rubin (1968) a Ettinger a Suter (1970).

Srovnání elektroencefalografických nálezů s literárními údaji může být pouze rámcové, neboť jiní autoři užívali ke svým sledováním jiné pokusné objekty než psy. I tak jsme však zjistili určité analogie s nálezy Szappanyose a kol. (1969) a Corssena a kol. (1969), pracujícími s opicemi a kočkami.

Szappanyos a kol. (1969) zjišťovali rolandické hroty a dokonce i generalizované hroty na dvou případech typické epileptické manifestace během celého průběhu narkózy. Tyto konvulzivní změny nastaly u koček a opic po dávkách 6 až 10 mg/kg ketaminu, podaných *i. m.* nebo *i. v.*

Corssen a kol. (1969) podával kočkám ketamin v dávce 4 mg/kg *i. v.* Na základě svých zjištění soudí, že ketamin působí disociativně, že kortikothalmický systém tlumí — zejména kůru frontální, zatímco limbický systém aktivuje na rozdíl od ostatních celkových anestetik.

V našich případech jsme získali u dvou, resp. u tří zvířat iritační potenciály, které byly místně zdůrazněné. Naše zjištění, že v průběhu narkózy Ketala-

rem se na EEG objevují iritační grafoelementy, je ve shodě s uvedenými literárními údaji. K obdobným závěrům dospěl K u g l e r a kol. (1969) u zdravých lidí; rytmické synchronní komplexy z pomalých a strmých vln, trvajících až 3½ minuty, v průběhu narkózy ketaminem mu připomínaly změny u akutních toxických encefalóz.

V průběhu znecitlivění bylo zjištěno signifikantní snížení hodnot hemoglobinu a hematokritu, což je možné přičíst chlorpromazinu (K o m á r e k a kol. 1959). Zvýšení celkové bílkoviny je pouze relativní. Zvýšení glukózy bývá zjišťováno při svalových křečích (Š u t t a 1961). Koncentrace draslíkových iontů bývá mírou bazálního metabolismu. Při zvyšování pH extracellulární tekutiny dochází k jeho snížení (H o m o l k a 1969b). Protože zvýšení transaminázy GOT má vztah k více orgánům a tkáním, bývá odrazem změn v těchto tkáních.

Důležité je, že změny zjištěné při biochemickém vyšetření jsou krátkodobé a reversibilní.

Literatura

BECK C. C., COPPOCK R., OTT B. S., 1971, Evaluation of Vetalar (Ketamine HCl) A Unique Feline Anesthesia. Vet. Med. — Small Animal Clinician, 66, 10 : 993-997.

BECK C. C., DRESNER A. S., 1972, Vetalar (Ketamine HCl) a cataleptoid anesthetic agent for primate species. Vet. Med. — Small Animal Clinician, 67, 10 : 1082-1084.

COMMONS M., 1970, Clinical Experiences with Ketamine HCl as an Intramuscular General Anaesthetic in the cat. Vet. Med. — Small Animal Clinician, 65, 12 : : 1151-1152.

CORSSEN G. a kol., 1969, Dissociative Anaesthesie mit Ketamine (CI-581). In: Anaesthesiologie und Wiederbelebung. Springer-Verlag, Berlin, 40 : 64-69

DÜRR U. M., KRAFT W., 1971, Die Anwendung von Ketamin-hydrochlorid (Ketanest) zur Ruhigstellung von Katzen. Tierärztl. Umsch. 26 : 402-404.

ETTINGER S. J., SUTER P. F., 1970, Canine Cardiology. 1. vydání, Philadelphia, W. B. Saunders Company, 616 s.

HERLES F., 1954, Základy elektrokardiologie. 3. vydání, SZN, Praha, 307 s.

HOMOLKA J., 1969a, Klinická biochemie. SZN, Praha, 434 s.

HOMOLKA J., 1969b, Klinické biochemické vyšetřovací metody. SZN, Praha, 438 s.

HOŘEJŠÍ J. a kol., 1957, Základy chemického vyšetřování v lékařství. 5. vydání, SZN, Praha, 532 s.

HUMPHREY W. J., 1971, Ketamin HCl as a general anesthetic in dogs. Mod. vet. Pract. 52, 6 : 38-39.

KAPLAN B., 1972, Ketamine HCl Anesthesia in Dogs. Observation of 327 Cases. Vet. Med. — Small Animal Clinician, 67, 6 : 631-634.

KITTLE E. L., 1971, Ketamine HCl as an anesthetic for birds. Mod. vet. Pract. 52, 11 : 40-41.

KOMÁREK J., POSPÍŠIL I., JANEČEK J., 1959, Chloropromazin a změny krevního obrazu. Vet. Med. (Praha) 4, 4 : 271-282.

KRÁL E., NĚMEČEK L., PAVLICA J., 1970, Použití Ketalaru u koček. Referát na 5. semináři Sekce chirurgie a ortopedie SVL, Brno.

KRÁL E., NĚMEČEK L., PAVLICA J., 1972a, Použití Ketalaru u psů. Referát na 6. semináři Sekce chirurgie a ortopedie SVL, Michalovce.

KRÁL E., NĚMEČEK L., PAVLICA J., 1972b, Disociační anestézie ketaminem u koček. Vet. Med. (Praha) 17, 9 : 545-550.

KUGLER J. a kol., 1969, Elektroencephalografische Untersuchungen bei Ketamine und Methohexital. In: Anaesthesiologie und Wiederbelebung. Springer Verlag Berlin, 40 : 101-109.

MANDELKER L., 1972, Ketamine hydrochloride as an anesthetic for paratects. Vet. Med. — Small Animal Clinician, 67, 1 : 55-56.

RUBIN G. S., 1968, Applications of Electrocardiology in Canine Medicine. J. Am. vet. med. Ass. 153, 1 : 17-39.

SCHRÖDER R., SÜDHOF H., 1971, Hodnocení EKG v praxi. 1. vydání, Avicenum, SZN, Praha, 107 s.

SZAPPANYOS G. a kol., 1969, The Effect of Ketamine (CI-581) on the Cardiovascular and Central Nervous System. In: Anaesthesiologie und Wiederbelebung. Springer-Verlag, Berlin, 40 : 70-92.

ŠUTTA J., 1961, Sledovanie účinku novších myorelaxačných prostriedkov a stanovenie možností ich využitia i v kombinácii s niektorými spôsobmi celkovej anestézy u domácich zvierat. Kand. dis. práce, Košice.

Došlo dne 17. 4. 1973

КРАЛ Э., НЕМЕЧЕК Л., ПАВЛИЦА Й., РОЗТОЧИЛ В. (Вышшая школа ветеринарной медицины, Брно, Чехословакия). **Анестезия гидрохлоридом кетамина у собак.** Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 397-408, 1973.

Хлорпромазин в дозе 3 мг/гк ж. в. и гидрохлорид кетамина в дозе 15 мг/кг ж. в. при внутримышечном введении приводят к достаточному успокоению и болеутолению, чтобы можно было произвести обычные операционные вмешательства. Комбинация вызывает заметное понижение температуры тела, объема дыхания и минутного объема дыхания. Электрокардиографическим путем определяли аритмию на основе расстройства проводимости и экстрасистолической аритмии. Эллектроэнцефалографические диагнозы показали существование раздражающих графоэлементов. Гидрохлорид кетамина и хлорпромазин снижают величины гемаглобина, гематокрита, всего белка и уровень калия. И наоборот, они увеличивают уровень глюкозы и величины трансаминазы глутамуксусной кислоты. На кровяные элементы седиментации, уровень Na и GPT эти вещества не влияют.

общее обезболивание; хлорпромазин; кетамин гидрохлорид; пульс; дыхание; температура; спирометрия; EKG; EEG; кровь; белки; глюкоза; трансаминазы; собака

KRÁL E., NĚMEČEK L., PAVLICA J., ROZTOČIL V. (University School of Veterinary Medicine, Brno, Czechoslovakia). *Anaesthesia through Ketamine Hydrochloride in Dogs.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 397-408, 1973.

Chlorpromazine in a dosis of 3 mg/kg live weight and ketamine hydrochloride in a dosis of 15 mg/kg live weight applied *i. m.* lead to a sufficient sedation and analgesia enabling simple operations. This combination causes a considerable reduction of body temperature, of the breath and per minute breath volume. Arrhythmiae caused by conductivity disturbances and extrasystolic arrhythmiae were determined electrocardiographically. Electroencephalographic findings showed irritation graphoelements. Ketamine hydrochloride with chlorpromazine reduces the haemoglobin, haematokrit and total protein value and the potassium level. On the other hand it increases the glucosis level and the glutamoacetic acid transaminasis values. The blood elements of sedimentation, the Na level and the GPT were not affected.

general anaesthesia; chlorpromazine; ketamine hydrochloride; pulse; breath; temperature; spirometry; EKG; EEG; blood; proteins; glucosis; transaminases; dog

KRÁL E., NĚMEČEK L., PAVLICA J., ROZTOČIL V. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno, Tschechoslowakei). *Anästhesie durch Ketaminhydrochlorid bei Hunden.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 397-408, 1973.

Das *i. m.* verabreichte Chlorpromazin in einer Gabe von 3 mg/kg Lebendgewicht und Ketaminhydrochlorid in einer Gabe von 15 mg/kg Lebendgewicht führen zu einer genügenden Sedation und Analgesie, die gewöhnliche Operationen ermöglichen. Diese Kombination verursacht eine wesentliche Herabsetzung der Körpertemperatur, des Atem- und Minutenatemvolumens. Arrhythmien infolge Leitungsfähigkeitsstörungen und extrasystolische Arrhythmien wurden elektrokardiographisch festgestellt. Elektroenzephalographische Befunde wiesen Irritationsgraphoelemente nach. Das Ketaminhydrochlorid mit Chlorpromazin setzt den Hämoglobin-, Hämatokrit- und Gesamteiweißwert und den Kaliumspiegel herab. Dagegen steigert es den Glukosenspiegel und die Glutamoessigsäurentransaminasenwerte. Die Sedimentationsblutelemente, der Na-Spiegel und die GPT wurden nicht beeinflußt.

allgemeine Anästhesie, Chlorpromazin; Ketaminhydrochlorid; Puls; Atem; Temperatur; Spirometrie; EKG; EEG; Blut; Eiweißstoffe; Glukose; Transaminasen; Hund

Adresa autorů:

Prof. MVDr. E. Král, MVDr. L. Němeček, MVDr. J. Pavlica, doc. MVDr. V. Roztočil, CSc., Vysoká škola veterinární, katedra reprodukce hospodářských zvířat a chirurgie, 612 42 Brno, Palackého 1—3

ÚČAST PROTOZOÁLNÍ POPULACE NA FERMENTACI LIPIDŮ V BACHORU

F. Doležel, S. Bartoš, A. Jukl

Laboratoř fyziologie a genetiky živočichů, ČSAV, Uhříněves

DOLEŽEL F., BARTOŠ S., JUKL A. *Účast protozoální populace na fermentaci lipidů v bachoru.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 409-416, 1973.

Pomocí inkubace bachorové tekutiny s plnou bakteriální a protozoální populací a čištěné bachorové tekutiny, která obsahovala pouze protozoální populaci, byla sledována účast protozoí při lipolýze lipidových složek krmiva. K pokusům bylo použito čtyř koz — kříženců, kterým byla naoperována permanentní bachorová píštěl. Zvířata byla krmena 14 dní před pokusem a během celého pokusného období dvakrát denně vojtěškovým senem *ad libitum* a ječným šrotem 0,5 kg na den. Bachorová tekutina byla odebírána 3 hodiny po začátku krmení a během celého zpracování udržována při 39 °C. Bylo zjištěno, že jak u bachorové tekutiny s plnou bakteriální i protozoální populací, tak u čištěné bachorové tekutiny, která obsahovala pouze protozoální populaci, dochází během inkubace se značeným trioleátem-1-^{14}C ke snižování počtu impulsů u triglyceridů a růstu impulsů u mastných kyselin. To znamená, že v obou případech docházelo k lipolýze. Značná lipolytická aktivita, která byla zjištěna u protozoí, ukazuje, že protozoa mohou být významným činitelem při lipolytických procesech v bachoru. Vzhledem k složitým symbiotickým poměrům v bachoru však nebylo zatím možné uvést absolutní hodnoty, a tím vymezit přesný podíl účasti bakterií a protozoí při fermetačních procesech.

koza; bachorová mikroflóra; lipolýza

V lipidovém metabolismu přežvýkavců je několik odlišností od metabolismu monogastrických zvířat. Tato specifita je výsledkem mikrobiální aktivity v bachoru, při které jsou glyceridy krmiva v bachoru hydrolyzovány a nenasycené mastné kyseliny jsou hydrogenovány a jinak geometricky modifikovány tvorbou izomerů (Garton a kol. 1961; Garton 1967). Depotní tuk přežvýkavců má proto vysoký obsah mastných kyselin, zvláště kyseliny stearové. Mikroorganismy bachoru mají také značnou schopnost lipidy syntetizovat. Mikrobiální trávení a syntézu lipidů v bachoru provádějí pravděpodobně jak bakterie, tak protozoa. Účast protozoí však není zcela vyjasněna. V naší práci jsme se zaměřili na studium účasti protozoí při lipolýze lipidových složek krmiva pomocí inkubace čištěných protozoí s trioleátem, značeným radioaktivním uhlíkem ^{14}C.

MATERIÁL A METODY

K pokusům bylo použito čtyř koz kříženců, kterým byla naoperována permanentní bachorová píštěl. Zvířata byla krmena 14 dní před pokusem a během celého pokusného období dvakrát denně vojtěškovým senem *ad libitum* a ječným šrotem 0,5 kg na den.

Bachorová tekutina byla odebírána 3 hodiny po začátku krmení a během celého zpracování udržována při 39 °C. Bachorovou tekutinu jsme odebírali pomocí upraveného zařízení pro odběr a filtraci bachorové tekutiny (Doležel a kol. 1969).

Pro stanovení počtu protozoí v odebrané bachorové tekutině bylo použito Fuchs-Rosenthalových komůrek o výšce 200 μm. Bachorová tekutina byla kon-

zervována 5% formalinem a pro lepší viditelnost při počítání byla protozoa barvena Lugolovým roztokem. Celkové počty protozoí kolísaly v poměrně úzkém rozmezí; průměrné hodnoty se pohybovaly od 1,4 do $1{,}6.10^6$.

Inkubace byla prováděna ve 100ml infúzních lahvičkách s plynovým uzávěrem, umístěných v inkubátoru, za probublávání dusíkem, při 39 °C a 80 kyvech za minutu.

Z bachorové tekutiny, odebrané od jednoho zvířete, byly inkubovány vždy:

a) původní bachorová tekutina, která obsahovala plnou bakteriální a protozoální populaci,
b) čištěná bachorová tekutina, která obsahovala pouze protozoální populaci,
c) čištěná bachorová tekutina bez mikrobiální populace jako kontrola.

Promytá protozoa byla získána z bachorové tekutiny centrifugací a promýváním čištěnou bachorovou tekutinou a nárazníkem. Nárazník byl připravován vždy čerstvý den před pokusem podle Chalupy a kol. (1967). Aby nebyla snížena vitalita protozoí, bylo centrifugováno velmi šetrně při malém počtu obrátek a při teplotě 39 °C. Do centrifugačních zkumavek bylo odměřeno po 50 ml bachorové tekutiny. Počet obrátek při centrifugaci se pomalu zvyšoval během 2 minut na 900 až 1000 ot/min, pak byla centrifuga vypnuta a bez brzdění nechána, až se zastaví. Supernatant byl odtáhnut, na sediment přidáno 25 ml čištěné bachorové tekutiny a 25 ml nárazníku, zahřátých na 39 °C, obsah opatrně rozmíchán a znovu odstředěn. Toto promývání se opakovalo celkem dvakrát.

Čištěná bachorová tekutina byla připravena ultracentrifugací odebrané bachorové tekutiny při 40 000 ot/min a 4 °C po dobu 10 minut (centrifuga VAC-60, Janetzki, NDR). Supernatant byl odtáhnut a ještě jednou centrifugován za stejných podmínek.

Emulze značeného trioleátu-1-^{14}C byla připravována ze značeného trioleátu o specifické aktivitě 34,1 mCi/mM (R. C. Amersham, Anglie). K cca 25 μCi značeného trioleátu bylo přidáno 0,5 ml lněného oleje a 12 ml čerstvě odebrané bachorové tekutiny a směs byla emulgována na ultrazvukovém desintegrátoru Soniprobe — typ 1130A (Dawe Instr. Ltd.) při 8 A. Před použitím byla emulze temperována na 39 °C. Výsledná radioaktivita v jednotlivých nádobkách byla cca 2 μCi. Trioleát jsme emulgovali s bachorovou tekutinou proto, poněvadž v ní je dostatek bílkovin, které umožňují stálost emulze a nebylo tedy třeba použít různých emulgátorů, nespecifických pro obsah bachoru.

Nádobky s plnou bakteriální i protozoální populací a nádobky s čištěnou bachorovou tekutinou, která obsahovala pouze protozoální populaci, byly inkubovány po dobu 0, 1, 2, 4 a 6 hodin. Po skončené inkubaci byly nádobky vyjmuty z inkubační lázně a z celkového obsahu byly extrahovány lipidy metodou Storryho a Rooka (1965). Nulový vzorek byl připravován stejně jako vzorky ostatní, nebyl však inkubován; extrahován byl bezprostředně před zahájením inkubace (v čase t_0).

Čištěná bachorová tekutina byla kontrolována inkubací po dobu 0 a 6 hodin. Měřením aktivity v triglyceridech a mastných kyselinách bylo zjištěno, že námi použitý postup přípravy zajišťuje, že čištěná bachorová tekutina nemá žádnou lipolytickou aktivitu, a že tedy nemůže ovlivnit výsledky pokusu.

Extrahované celkové lipidy byly rozděleny na jednotlivé lipidové frakce chromatografií na tenké vrstvě metodou Poledneho (1966). Radioaktivita v jednotlivých frakcích byla stanovena po seškrábnutí skvrn do scintilačních nádobek a přelití Brayovou tekutinou.

Veškerá měření radioaktivity byla provedena na Mark I Nuclear Chicago spektrometru pro tekutou scintilaci.

VÝSLEDKY

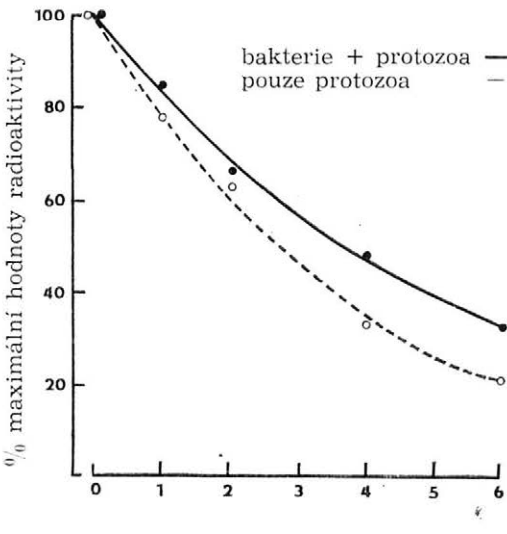
Změny radioaktivity v triglyceridech izolovaných v průběhu inkubace z bachorové tekutiny s plnou bakteriální i protozoální populací v jednotlivých pokusech jsou uvedeny v tab. I. Radioaktivita je vyjádřena jako imp/min . 10^{-3} na 1 ml bachorové tekutiny. Protože průběh lipolýzy triglyceridů na mastné kyseliny vykazoval závislost I. řádu, byly naměřené výsledky zlogaritmovány a zpracovány metodou nejmenších čtverců. Z rovnice výsledných přímek byly vypočítány poločas $t_{1/2}$ a rychlostní konstanta k (K l e i b e r 1961). U I. série pokusů byl zjištěn poločas 4,0 hod a u II. série pokusů 3,5 hod. Rychlostní konstanta u I. série pokusů činí −0,00288 a u II. série −0,00327. Průměrné hodnoty radioaktivity v triglyceridech obou sérií pokusů byly po odlogaritmování vyneseny jako procenta maximální hodnoty (tj. % radioaktivity naměřené v triglyceridech v čase t_o) do obr. 1. Průměrný poločas lipolýzy triglyceridů izolovaných v průběhu inkubace z bachorové tekutiny s plnou bakteriální i protozoální populací činil 3,8 hod a rychlostní konstanta $k = -0{,}00306$.

Změny radioaktivity v triglyceridech izolovaných v průběhu inkubace z čištěné bachorové tekutiny, která obsahovala pouze protozoální populaci, byly vyjádřeny jako imp/min . 10^{-3} na 1 ml původní bachorové tekutiny, ze které byla protozoa izolována (tab. I). Tento přepočet byl proveden z toho důvodu, aby bylo možno vzájemně porovnávat absolutní hodnoty radioaktivity v izolovaných triglyceridech jak v pokusech, kde byla použita bachorová tekutina s plnou bakteriální i protozoální populací, tak v pokusech, kde byla inkubována čištěná bachorová tekutina, která obsahovala pouze protozoální populaci.

I. Radioaktivita v triglyceridech izolovaných v průběhu inkubace z bachorové tekutiny s plnou bakteriální i protozoální populací a z čištěné bachorové tekutiny, která obsahovala pouze protozoální populaci
Z logaritmických hodnot byly vypočítány poločas $t_{1/2}$ a rychlostní konstanta k
Hodnoty jsou průměry ze tří stanovení

Doba inkubace hod	imp/min . 10^{-3} na 1 ml bachorové tekutiny v triglyceridech (A)							
	pokus I.				pokus II.			
	A	log A	$t_{1/2}$	k	A	log A	$t_{1/2}$	k
Bachorová tekutina s plnou bakteriální i protozoální populací:								
0	160,0	2,204	4,0	−0,00288	130,0	2,113	3,5	−0,00327
1	133,7	2,123			107,1	2,029		
2	108,9	2,037			80,0	1,903		
4	83,7	1,922			55,8	1,746		
6	54,9	1,739			40,5	1,607		
Čištěná bachorová tekutina, obsahující pouze protozoální populaci:								
0	70,6	1,848	2,8	−0,00405	60,0	1,778	2,4	−0,00465
1	63,1	1,800			45,9	1,662		
2	54,2	1,734			33,0	1,518		
4	26,9	1,429			19,5	1,290		
6	18,1	1,258			11,0	1,041		

V I. sérií pokusů, ve kterých bylo použito pouze protozoální populace, byl zjištěn poločas lipolýzy triglyceridů 2,8 hod a u II. série pokusů 2,4 hod. Rychlostní konstanta u I. série pokusů činí —0,00405 a u II. série pokusů —0,00465. Průměrné hodnoty v triglyceridech v těchto sériích pokusů byly po odlogaritmování vyneseny jako procenta maximální hodnoty do obr. 1. Průměrný poločas lipolýzy triglyceridů izolovaných v průběhu inkubace čištěné bachorové tekutiny, která obsahovala pouze protozoální populaci, činil 2,7 hod a rychlostní konstanta $k = -0{,}00433$. Z uvedených výsledků vyplývá, že lipolýza triglyceridů probíhala rychleji v čištěné bachorové tekutině, která obsahovala pouze protozoální populaci než v původní bachorové tekutině s plnou bakteriální i protozoální populací.



1. Změny radioaktivity v triglyceridech izolovaných v průběhu inkubace z bachorové tekutiny s plnou bakteriální i protozoální populací a z čištěné bachorové tekutiny, která obsahovala pouze protozoální populaci, vyjádřené v % maximální hodnoty radioaktivity
Body jsou průměrné hodnoty naměřené v obou pokusech
Proložení křivky bylo provedeno pomocí hodnot vypočítaných z logaritimického tvaru rovnice přímky

Vyjádření změn radioaktivity v mastných kyselinách bylo o něco složitější. Poněvadž jsme značený trioleát emulgovali s bachorovou tekutinou, nebylo možné zabránit tomu, aby se po vytemperování emulze značeného trioleátu-1-^{14}C na 39 °C před přidáním do inkubačních nádobek částečně nerozběhla lipolýza. Proto radioaktivity naměřené v mastných kyselinách na začátku inkubace v čase t_c nebyly nulové, jak by měly teoreticky být, ale vykazovaly určitou aktivitu, která musela být od všech naměřených radioaktivit v mastných kyselinách izolovaných v jednotlivých časových úsecích odečtena.

Změny radioaktivity v mastných kyselinách izolovaných v průběhu inkubace z bachorové tekutiny s plnou bakteriální i protozoální populací v jednotlivých pokusech jsou uvedeny v tab. II. Radioaktivita je vyjádřena jako imp/min . 10^{-3} na 1 ml bachorové tekutiny, po odečtení bazální aktivity v čase t_o.

Také matematické zpracování změn radioaktivity v mastných kyselinách v průběhu inkubace se poněkud liší, protože bylo třeba se vyhnout nulové hodnotě radioaktivity v čase t_o (log 0 není definován). Logickou úvahou jsme došli k závěru, že maximální radioaktivita v mastných kyselinách nemůže přestoupit počáteční radioaktivitu v triglyceridech v čase t_o, protože mastné kyseliny vznikají lipolýzou těchto triglyceridů. Proto jsme při matematickém zpracování výsledků odečítali skutečně naměřené hodnoty radioaktivity v mastných kyselinách

II. Radioaktivita v mastných kyselinách izolovaných v průběhu inkubace z bachorové tekutiny s plnou bakteriální i protozoální populací a z čištěné bachorové tekutiny, která obsahovala pouze protozoální populaci

Do tabulky byla vynesena naměřená aktivita v mastných kyselinách (A) po odečtení aktivity v čase t_o. Z logaritmických hodnot byly vypočítány poločas $t_1/_2$ a rychlostní konstanta k

Protože log 0 není definován, byly při matematickém zpracování výsledků odečítány naměřené hodnoty radioaktivity v mastných kyselinách (A) od počáteční radioaktivity triglyceridů v čase t_o v týchž pokusech (tab. I)

Hodnoty jsou průměry ze tří stanovení

Doba inkubace hod	imp/min . 10^{-3} na 1 ml bachorové tekutiny v mastných kyselinách (A)									
	pokus I.					pokus II.				
	A	$TG_o - A$	log $(TG_o - A)$	$t_1/_2$	k	A	$TG_o - A$	log $(TG_o - A)$	$t_1/_2$	k
Bachorová tekutina s plnou bakteriální i protozoální populací:										
0	0	160,0	2,204	4,8	−0,00240	0	130,0	2,114	5,9	−0,00193
1	9,0	151,0	2,179			12,7	117,3	2,068		
2	41,9	118,1	2,072			32,5	97,5	1,989		
4	72,8	87,2	1,940			48,6	81,4	1,911		
6	88,8	71,2	1,852			65,3	64,7	1,811		
Čištěná bachorová tekutina, obsahující pouze protozoální populaci:										
0	0	70,6	1,849	7,3	−0,00157	0	60,0	1,778	2,4	−0,00470
1	1,9	68,7	1,837			0,8	59,2	1,772		
2	8,9	61,7	1,790			14,0	46,0	1,663		
4	14,1	56,5	1,752			43,0	17,0	1,230		
6	31,4	39,2	1,593			46,1	13,9	1,143		

(po odečtení aktivity v čase t_o) od počáteční radioaktivity triglyceridů v čase t_o v týchž pokusech.

U I. série pokusů, ve kterých byla inkubována bachorová tekutina s plnou bakteriální i protozoální populací, byl zjištěn poločas rychlosti tvorby mastných kyselin 4,8 hod a u II. série pokusů 5,9 hod. Rychlostní konstanta u I. série pokusů činí −0,00240 a u II. série pokusů −0,00193.

Změny radioaktivity v mastných kyselinách izolovaných v průběhu inkubace z čištěné bachorové tekutiny, která obsahovala pouze protozoální populaci, byly vyjádřeny jako imp/min . 10^{-3} na 1 ml původní bachorové tekutiny, ze které byla protozoa izolována (tab. II). V I. sérii pokusů, ve kterých bylo použito pouze protozoální populace, byl zjištěn poločas tvorby mastných kyselin 7,3 hod a u II. série pokusů 2,4 hod. Rychlostní konstanta u I. série pokusů činí −0,00157 a u II. série pokusů −0,00470.

Z uvedených výsledků vyplývá, že na rozdíl od lipolýzy triglyceridů je tvorba mastných kyselin relativně pomalejší a naměřené aktivity v mastných kyselinách vykazují podstatně vyšší rozptyl než aktivity naměřené v triglyceridech.

DISKUSE

Studium účasti protozoí na přeměně lipidů v bachoru je prakticky v počáteční fázi výzkumu. Hromadí se podklady pro to, že protozoa se účastní lipolýzy, hydrogenace nenasycených mastných kyselin a tvorby lipoidních komplexů. Jakou měrou se účastní právě protozoa na těchto přeměnách, se velmi těžko dá absolutně vyjádřit. Chalupa a Kutches (1968) prokázali velmi významnou účast protozoí na hydrogenaci nenasycených mastných kyselin pomocí kyselin značených ^{14}C. Nepracovali sice s čistými kulturami protozoí, avšak bakteriální kontaminace byla velmi omezena, takže můžeme předpokládat, že prokázaná hydrogenace je dílem především protozoí.

V našich pokusech jsme zjistili, že jak u bachorové tekutiny, tak u protozoí dochází během inkubace k snižování počtu impulsů u triglyceridů. To znamená, že v obou případech docházelo k lipolýze. Překvapující je, že rychlost poklesu hladiny značených triglyceridů u protozoí je dokonce o něco vyšší než u bachorové tekutiny. To svědčí o tom, že protozoa jsou významnými činiteli při lipolýze. Vyšší hodnoty rychlostních konstant u protozoí si vysvětlujeme tak, že protozoa čištěná nemají tolik lipolytického substrátu neznačeného, jako mají protozoa i bakterie v bachorové tekutině. Souběžně s poklesem aktivity u triglyceridů dochází k růstu aktivity u mastných kyselin. Hodnoty rychlostních konstant u mastných kyselin v bachorové tekutině jsou velmi blízké hodnotám naměřeným u protozoí. I tyto výsledky jen potvrzují správnost našich závěrů.

Absolutní hodnoty radioaktivity naměřené v triglyceridech a mastných kyselinách v pokusech s čištěnou bachorovou tekutinou, která obsahovala pouze protozoální populaci, jsou zhruba poloviční, protože v těchto pokusech byl radioaktivní trioleát přidáván k protozoím, která byla izolována z 50 ml bachorové tekutiny. Objem ostatních roztoků přidávaných k těmto inkubačním nádobkám byl volen tak, aby na 1 ml inkubované tekutiny připadalo dvojnásobné množství původní bachorové tekutiny, než tomu bylo v pokusech s plnou bakteriální i protozoální populací. Tyto nižší výchozí hodnoty ovšem nemohou ovlivnit velikost rychlostní konstanty. Abychom však mohli lépe porovnat průběh lipolýzy v pokusech s plnou bakteriální i protozoální populací a v pokusech se samotnou protozoální populací, byly naměřené hodnoty vyneseny do grafu jako procenta maximální hodnoty (tj. % radioaktivity naměřené v triglyceridech v ča-

se t_o), takže obě křivky vycházejí ze stejného bodu a mají stejné měřítko (obr. 1).

Účast bakterií na lipolýze v bachoru nechceme vyvracet, vždyť již v r. 1961 Hobson a Mann izolovali čisté kultury lipolytických bakterií z bachoru. Otázkou však zůstává, jak početná populace lipolytických bakterií v bachoru je, jak jsou tyto zárodky typické pro bachor a jak jsou fermentačně vybaveny. Garton a kol. (1961) uvádějí, že bakterie jsou hlavním lipolytickým agens v bachoru. Rovněž Wright (1961) přisuzuje značnou lipolytickou aktivitu bakteriím. Naproti tomu Hill a kol. (1960) uvádějí, že vyšší lipolitická aktivita byla pozorována u protozoí. K tomuto výsledku došli nepřímým pokusem.

Naše práce ukazuje, že protozoa mohou hrát významnou úlohu při lipolýze. Velmi vyrovnaná druhová protozoální populace u všech pokusných zvířat nám znemožnila určit hrubou lipolytickou aktivitu u jednotlivých druhů. Můžeme však předpokládat, že jednotlivé rody mají různou lipolytickou aktivitu. Prostudování přesné lipolytické aktivity u jednotlivých rodů naráží na problém, jak získat dostatečné množství těchto protozoí bez bakteriální kontaminace.

Literatura

DOLEŽEL F., BARTOŠ S., JUKL A., 1969, Zařízení pro odběr a filtraci bachorové tekutiny za anaerobních podmínek. Vet. Med. (Praha) 14 : 545-548.

GARTON G. A., LOUGH A. K., VIOQUE E., 1961, Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. J. Gen. Microbiol. 25 : 215-225.

GARTON G. A., 1967, The digestion and absorption of lipids in ruminant animals. Wld. Rev. Nutr. Diet. 7 : 225-250.

HILL F. D., LAYLOR J. H., ALLEN R. S., JACOBSON N. L., 1960, *In vitro* lipolysis by rumen ingesta. J. Anim. Sci. 19 : 1266.

HOBSON P. N., MANN S. O., 1961, The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of the sheep. J. Gen. Microbiol. 25 : 227-240.

CHALUPA W., O'DELL G. D., KUTCHES A. J., LAVKER R., 1967, Changes in rumen chemical characteristics and protozoa populations of animals with depressed milk fat tests. J. Dairy Sci. 50 : 1002.

CHALUPA W., KUTCHES A. J., 1968, Biohydrogenation of linoleic-1-^{14}C acid by rumen protozoa. J. Animal Sci. 27 : 1502-1508.

KLEIBER M., 1961, The fire of life. An introduction to animal energetics. Jahn Wiley & Sons, Inc., Publishers, New York-London.

POLEDNE R., 1966, Experimentální modely pro studium syntézy a esterifikace mastných kyselin v játrech. Kandidátská disertační práce, Ústav pro výzkum výživy lidu, Praha.

STORRY J. E., ROOK J. A. F., 1965, Effect in the cow of intraruminal infusions of volatile fatty acids and of lactic acid on the secretion of the component fatty acids of the milk fat and on the composition of blood. Biochem. J. 96 : : 210-217.

WRIGHT D. E., 1961, Bloat in cattle. XX. Lipase activity of rumen microorganisms. N. Z. Jl agric. Res. 4 : 216-223.

Došlo dne 18. 1. 1973

ДОЛЕЖЕЛ Ф., БАРТОШ С., ЮКЛ А. (Лаборатория физиологии и генетики животных ЧСАН, Угржиневес, Чехословакия). **Участие протозоальной популяции в ферментации липидов в рубце.** Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 409-416, 1973.

С помощью инкубации рубцовой жидкости с полной бактериальной и протозоальной популяцией изучали участие протозоев при липолизе липидных компонентов корма. В опытах участвовали 4 помесные козы с вставленной перманентной фистулой. Животных кормили 14 дней до опыта, а в течение всего подопытного периода — 2 раза в день люцерновым сеном вволю и ячменным шротом в количестве 0,5 кг в день. Рубцовую жидкость отбирали 3 часа после начала кормежки и сохраняли в течение всей обработки при 39 °С. Установлено, что как в жидкости с обеими популяциями, так и в очищенной и содержащей лишь протозоальную популяцию в ходе инкубации с меченым триолеатом-1-^{14}C количество импульсов триглицеридов сокращается, а у жирных кислот возрастает. Следовательно, в обоих случаях имеет место липолиз. Обнаруженная в протозоидах значительная липолитическая активность показывает, что протозои могут быть важным фактором липолитичес-

ких процессов в рубце. Ввиду сложных симбиотических отношений в рубце пока нельзя привести абсолютные величины, выделив таким образом точное участие бактерий и протозоидов в процессах ферментации.

коза; рубцовая микрофлора; липолиз

DOLEŽEL F., BARTOŠ S., JUKL A. (Laboratory of Animal Physiology and Genetics of the Czechoslovak Academy of Sciences, Uhříněves, Czechoslovakia). *Participation of Protozoal Population at the Fermentation of Lipids in the Omasum.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 409-416, 1973.

The participation of protozoa at the lipolysis of the lipid components of feed was investigated by means of incubation of the omasum fluid with a full bacterial population and a cleaned omasum fluid containing only protozoal population. 4 cross-bred goats to which a permanent omasum fistula was operated-on were used in the experiment. The animals were fed twice a day lucerne hay *ad libitum* and 0,5 kg per day crushed barley for 14 days before the experiment and during the whole experiment period. The omasum fluid was taken 3 hours after the beginning of feeding and maintained at a temperature of 39 °C over the total processing period. It was found that as well in the omasum fluid with full bacterial and protozoal population as in the cleaned omasum fluid containing only protozoal population a diminution of the number of impluses in triglycerides and an increase of the number of impulses in fat acids takes place during incubation with marked trioleate-1-^{14}C. This indicates that lipolysis occurred in both cases. The considerable lipolytic activity found in protozoa indicates that protozoa can be an important factor in lipolytic processes in the omasum. Due to the complicated symbiotic conditions in the omasum, however it was so far not possible to state absolute values and to determine herewith the exact share of participation of bacteria and protozoa at fermentation processes.

goat; omasum microflora; lipolysis

DOLEŽEL F., BARTOŠ S., JUKL A. (Laboratorium für Lebewesenphysiologie- und genetik der Tschechosl. Akademie der Wissenschaften, Uhříněves, Tschechoslowakei). *Teilnahme der protozoalen Population an der Lipidenfermentation im Pansen.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 409-416, 1973.

Mittels Inkubation der Pansenflüssigkeit mit einer vollkommenen bakterialen und protozoalen Population und der gereinigten Pansenflüssigkeit, die nur die protozoale Population enthielt, wurde die Protozoenteilnahme bei der Lipolyse der Lipidbestandteile des Futters untersucht. Für die Versuche wurden 4 Kreuzlingsziegen, denen eine permanente Pansenfistel aufoperiert wurde, benützt. 14 Tage vor dem Versuch und im Laufe der ganzen Versuchsperiode wurden die Tiere zweimal täglich mit Luzerneheu *ad libitum* und mit Gersteschrott in einer Menge von 0,5 kg pro Tag gefüttert. Die Pansenflüssigkeit wurde 3 Std. nach dem Anfang der Fütterung entnommen und im Laufe der ganzen Bearbeitung bei einer Temperatur von 39 °C gehalten. Es wurde festgestellt, daß sowohl bei der Pansenflüssigkeit mit der vollkommenen bakterialen und protozoalen Population als auch bei der gereinigten Pansenflüssigkeit die nur die protozoale Population enthielt im Laufe der Inkubation mit dem markierten Trioleat-1-^{14}C eine Verminderung der Impulsenanzahl bei Triglyzeriden und ein Imuplsenanstieg bei Fettsäuren erfolgt. Das heißt, daß in beiden Fällen eine Lipolyse erfogte. Die beträchtliche lipolytische Aktivität, die bei den Protozoen festgestellt wurde weist darauf hin, daß die Protozoen ein bedeutungsvoller Faktor bei den lipolytischen Prozessen im Pansen sein können. Mit Rücksicht auf die komplizierten symbiotischen Verhältnisse im Pansen war es jedoch vorläufig nicht möglich die absoluten Werte anzuführen und dadurch den genauen Anteil der Bakterien- und Protozoenteilnahme an den Fermentationsprozessen zu bestimmen.

Ziege; Pansenmikroflora; Lipolyse

Adresa autorů:

MVDr. F. Doležel, CSc., ing. St. Bartoš, DrSc., ing. A. Jukl, CSc., ČSAV, Laboratoř fyziologie a genetiky živočichů, 251 61 Uhříněves

---

VÝMENNÉ PROCESY DUSÍKA MEDZI KRVOU A BACHOROVÝM OBSAHOM U OVIEC PRED A PO KŔMENÍ

J. Várady, K. Boďa, M. Bajo, M. Szanyiová, J. Tomáš

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

VÁRADY J., BOĎA K., BAJO M., SZANYIOVÁ M., TOMÁŠ J. *Výmenné procesy dusíka medzi krvou a bachorovým obsahom u oviec pred a po kŕmení.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 417-424, 1973.

Na dvoch ovciach s fistulou bachora a izolovaným bachorom sa v ôsmich pokusoch sledovalo množstvo celkového a amoniakálneho dusíka bachorovej tekutiny v izolovanom bachore pred a po kŕmení. Bachorová tekutina bola pri každom odbere (pred kŕmením, 1, 2, 3, 4, a 5 hodín po kŕmení) aplikovaná do izolovaného bachora a ponechaná v ňom počas 60 minút. Uvedený postup umožnil vyčísliť tzv. netto pasáž dusíka, čo je v podstate rozdiel medzi sekretovaným a vstrebaným množstvom dusíka v izolovanom bachore. Zistilo sa, že množstvo celkového a amoniakálneho dusíka v izolovanom bachore sa pred kŕmením zvyšuje, po kŕmení znižuje. Z toho vyplýva, že pred kŕmením prevláda pasáž dusíka z krvi do bachora, po kŕmení naopak — vstrebávanie z bachora do krvi. Zistila sa kladná korelácia medzi rozdielmi celkového a amoniakálneho dusíka pred a po inkubácii v izolovanom bachore.

ovce; dusíkový metabolizmus; rumino-hepatálny kolobeh; sekrécia a vstrebávanie dusíka v bachore; netto pasáž dusíka

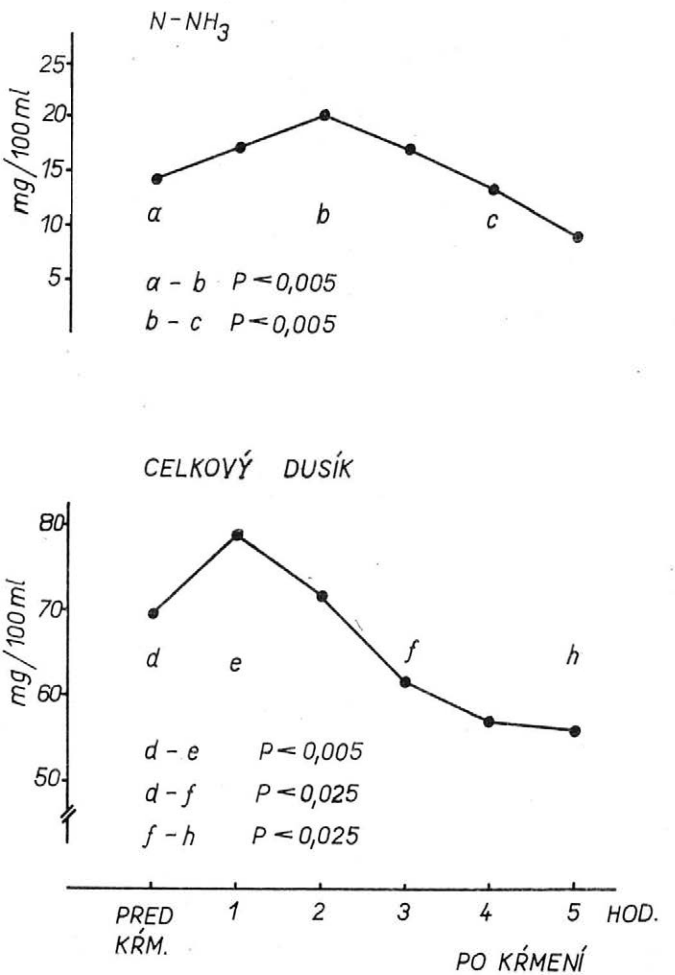
Počas posledných 10—15 rokov sa jednoznačne ukázalo, že výmenné procesy medzi obsahom predžalúdkov a krvou majú veľký význam v celkovom metabolizme u prežúvavcov. Z predžalúdkov sa intenzívne vstrebáva do krvi a prechádza opačným smerom celý rad metabolických produktov. Tieto výmenné procesy zrejme zaisťujú v predžalúdkoch optimálne podmienky pre tvorbu mikrobálnych bielkovín, ktoré sú počas ďalšieho metabolizmu stavebným materiálom pre celý organizmus. Veľmi dôležité miesto v týchto procesoch má prechod dusíkatých látok z bachora do krvi a opačne. Už v r. 1948 Mc Donald ako prvý zistil vstrebávanie NH_3 z bachora a konštatoval, že množstvo dusíka, ktoré sa týmto spôsobom dostáva do krvi, je cca 3—4 g u oviec za deň. Gray a Pilgrim (1956) zistili, že asi 60 % dusíka prijatého krmiva sa vstrebá vo forme amoniaku. Údaje o značnom vstrebávaní NH_3 z bachora nachádzame vo viacerých prácach. Okrem toho sa z bachora vstrebáva dusík aj vo forme amínokyselín (Leibholz 1971, Kurilov a Krotkova 1971).

Ešte dôležitejšiu úlohu hrá u prežúvavcov prechod dusíkatých látok z krvi do bachora. Rozsah sekrécie krvnej močoviny (Boďa a Várady 1966, Kaplan a Bojko 1963) i iných N-metabolitov, ako napríklad aminokyselín, po-

lypeptidov a bielkovín (G ž i c k i j a R o z g o n i 1960, V á r a d y a kol. 1968) kolíše v širokých rozmedziach a môže dosahovať značných rozmerov. Podľa výsledkov A l i e v a a A l i e v o v e j (1965) a J a v o n e n k a (1966) môže prechádzať dusík z krvi do bachora i po nakŕmení, alebo v čase, keď v bachore je dostatočné množstvo dusíka. Z toho sa dá usudzovať o súčasnom vstrebávaní N-látok z bachora do krvi a o prestupe v opačnom smere. Úlohou tejto práce bolo zistiť rozdiel medzi procesmi sekrécie a vstrebávania dusíka (tzv. netto pasáž) v bachore pred kŕmením a v jednotlivých časových intervaloch po kŕmení.

MATERIÁL A METÓDY

Pokus sa prevádzal na dvoch ovciach plemena merino vo veku okolo piatich rokov, váhy 50—60 kg, s malým izolovaným bachorom a permanentnou fistulou bachora. Zvieratá boli kŕmené dvakrát denne (kŕmna dávka: seno 0,5 kg, jačmeň 0,3 kg, otruby 0,2 kg) — ráno o 7.00 hod a popoludní o 15.30 hod

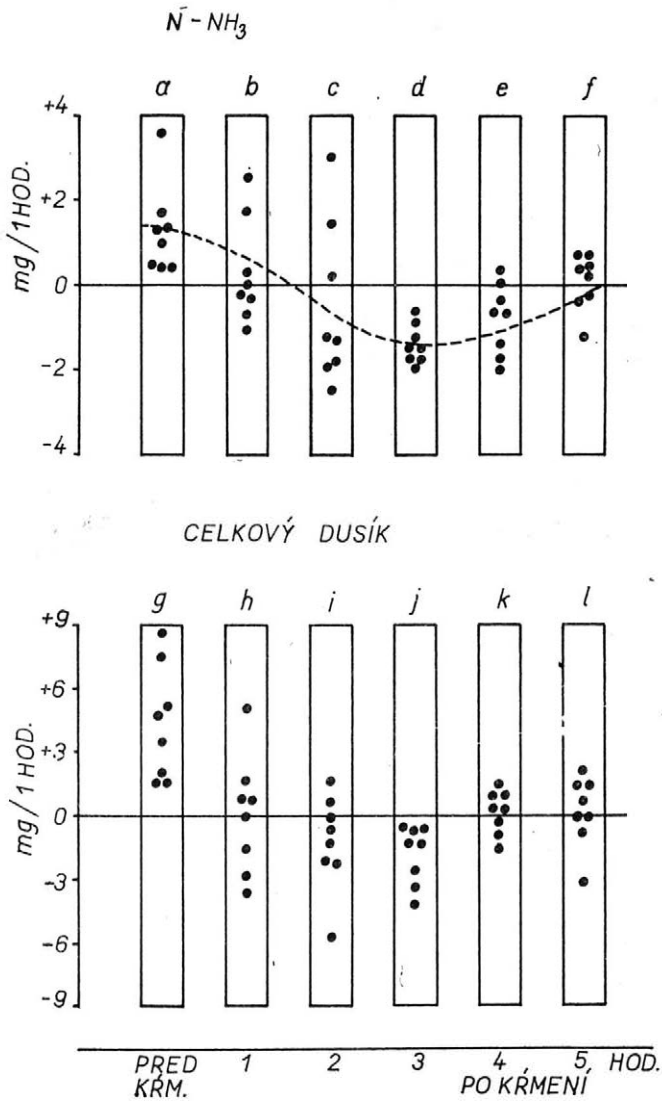


1. Priemerné hodnoty koncentrácie dusíka amoniaku (hore) a celkového dusíka (dole) v bachore oviec pred a 1, 2, 3, 4, a 5 hodín po kŕmení. Každá hodnota je priemerom 8 odberov

v priebehu štyroch týždňov s príjmom vody a soli *ad libitum*. U každej ovce sa urobili štyri vyšetrenia, čím sa obdržalo osem sérií odberov.

Chirurgické vyhotovenie izolovaného bachora sa robilo metódou podľa G r i d i n a a kol. (1964). Po vyvedení fistuly izolovaného bachora 3—4 cm kuadálne od transverzálneho chirurgického rezu sa naložila fistula na bachor a vyviedla kraniálne od rezu vo vzdialenosti 3—4 cm. Prvé štyri dni izolovaný bachor bol vyplachovaný niekoľkokrát denne striedavo autogénnou bachorovou šťavou a fyziologickým roztokom s prísadou neomycínu. Od štvrtého dňa bol preplachovaný a plnený denne 3—4X iba filtrovanou bachorovou tekutinou.

Odbery vzoriek sa prevádzali tak, že jednu hodinu pred kŕmením sa odoberalo cca 60 ml bachorového obsahu, ktorý sa prefiltroval a po odobratí vzorky pre stanovenie NH_3 a celkového dusíka sa z neho aplikovalo presne 40 ml do vypláchnutého izolovaného bachora. Po jednej hodine bol celý obsah vytiahnutý,



2. Individuálne rozdiely hodnôt dusíka amoniaku (hore) a celkového dusíka (dole) pred a po jednohodinovej inkubácii bachorového obsahu v izolovanom bachore. Vodorovná čiara udáva (0) množstvo dusíka, ktoré sa nachádzalo v bachorovej tekutine aplikovanej do izolovaného bachora. Hodnoty nad čiarou udávajú, koľko dusíka pribudlo v izolovanom bachore, hodnoty pod čiarou — koľko dusíka ubudlo z inkubovanej bachorovej tekutiny po jednohodinovej inkubácii
Štatistické hodnotenie:
a — b nesign;
a — c $P<0{,}005$;
a — d $P<0{,}005$;
d — e nesign;
d — f $P<0{,}005$;
g — h $P<0{,}05$;
g — i $P<0{,}005$;
g — j $P<0{,}005$;
j — k $P<0{,}01$;
j — l $P<0{,}005$

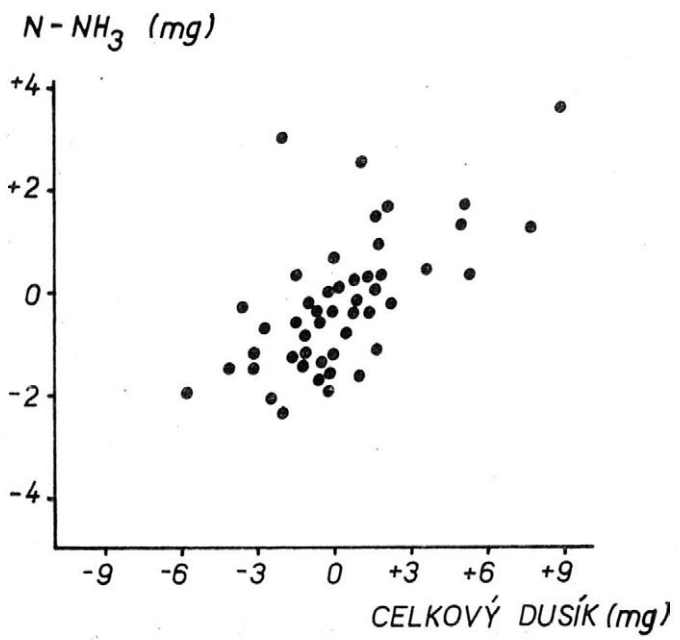
vypláchnutý 2 × 20 ml fyziologického roztoku a odobrala sa vzorka pre stanovenie NH_3 a celkového dusíka. Tento postup bol zachovaný v priebehu 1, 2, 3, 4 a 5 hodín po kŕmení. Takýmto spôsobom sa spoľahlivo dalo zistiť množstvo aplikovaného dusíka (celkového a NH_3) s bachorovou tekutinou do izolovaného bachora a množstvo po jednohodinovej inkubácii, pri zachovaní rovnakých podmienok v izolovanom i vo veľkom bachore.

Koncetrácia amoniaku v bachorovej tekutine (pred i po inkubácii) sa stanovovala metódou podľa Zöllnera a Birka (1958). Celkový dusík sa určoval Kjehldalovou metódou. Každá analýza NH_3 i celkového dusíka sa prevádzala v dvoch paralelných stanoveniach z každého odberu.

VÝSLEDKY

Koncentrácia amoniaku v bachorovom obsahu po kŕmení stúpa ($P<0,005$) a dosahuje maxima po dvoch hodinách. V priebehu 3—5 hodín klesá ($P < 0,005$) a v štvrtej hodine už dosahuje hodnoty pred kŕmením. Taktiež hladina celkového dusíka bachorovej tekutiny po nakŕmení stúpa ($P < 0,005$) a dosahuje maxima v prvej hodine. V priebehu ďalších dvoch hodín prudko klesá, v tretej hodine po kŕmení je nižšia ako pred kŕmením ($P < 0,025$). V priebehu 3—5 hodín ešte klesá ($P < 0,025$), avšak menej intenzívne ako 1—3 hodiny po nakŕmení (obr. 1).

Na obr. 2 sú znázornené rozdiely hodnôt N — NH_3 a celkového N bachorovej tekutiny pred a po jednohodinovej inkubácii v izolovanom bachore. (Hodnota „0" predstavuje to množstvo dusíka, ktoré sa nachádzalo v bachorovej tekutine aplikovanej do izolovaného bachora.) V období pred kŕmením sa zistili



3. Korelácia medzi rozdielmi hodnôt celkového a amoniakálneho dusíka pred a po inkubácii bachorovej tekutiny v izolovanom bachore pred, 1, 2, 3, 4 a 5 hodín po kŕmení ($n = 48$, $r = 0,605$, $P<0,001$)

pri celkovom i amoniakálnom dusíku kladné hodnoty, t. j. ich celkové množstvo po hodinovej inkubácii v izolovanom bachore bolo väčšie ako množstvo aplikované. V priebehu 1—3 hodín po kŕmení sa tieto rozdiely presúvajú na stranu negatívnu s maximom v tretej hodine, kedy vo všetkých prípadoch množstvo z izolovaného bachora odobratého dusíka (NH_3 aj celkového) po inkubácii bolo menšie ako aplikované. Po 4—5 hodinách nastáva opačný jav.

Medzi hodnotami rozdielov (pribúdanie resp. úbytok) N — NH_3 a celkového dusíka inkubovanej bachorovej tekutiny v izolovanom bachore (obr. 3) sa zistila významná korelácia ($n = 48$, $r = 0{,}605$, $P < 0{,}001$).

DISKUSIA

Z bachora do krvi sa vstrebáva pomerne značné množstvo dusíka v závislosti od množstva a zloženia kŕmnej dávky. Intenzita vstrebávania je najvýraznejšia po kŕmení a závisí od dietetických pomerov. Podobne i množstvo dusíka, ktoré prestupuje z krvi späť do bachora, kolíše v širokých rozmedziach nielen pri rozdielnych nutričných stavoch organizmu, ale aj počas denného kŕmneho režimu (Boďa a Várady 1966, Várady a kol. 1969, Kaplan a Bojko 1963 a pod.).

V našich pokusoch sa ukázalo, že množstvo celkového i amoniakálneho dusíka bachorovej tekutiny po 60 min. inkubácie v izolovanom bachore sa pred kŕmením zvýšilo, po kŕmení naopak znížilo. Pri daných podmienkach k uvedenému zvýšeniu dusíka môže dôjsť jedine jeho prechodom z krvi do izolovaného bachora a naopak, k zníženiu iba vstrebaním do krvi. Smerodajným ukazovateľom v týchto výmenných procesoch je celkový dusík, pretože zmeny v hodnotách celkového množstva N — NH_3 by mohli byť ovplyvňované i proteolytickou alebo proteosyntetickou schopnosťou mikroflóry bachorovej tekutiny.

Z prezentovaných výsledkov jednoznačne vyplýva, že pri diétach s dostatočným množstvom N-látok prevláda pred kŕmením sekrécia dusíka z krvi do bachora, po kŕmení je jav opačný, t. j. vstrebávanie z bachora do krvi. Pri diétach s nedostatočným alebo zvýšeným množstvom dusíka bude pravdepodobne stimulovaný jeden alebo druhý dej týchto výmenných procesov N-látok cez stenu predžalúdka. Vzájomná výmena dusíka medzi bachorovým obsahom a krvou sa pravdepodobne bude odohrávať v prevažnej miere vo forme vstrebávania amoniaku z bachora do krvi a vo forme prechodu krvnej močoviny do bachora, pretože medzi úbytkom a zvyšovaním celkového a amoniakálneho dusíka v izolovanom bachore je dobrá korelácia. Močovina prestupujúca z krvi do bachora sa môže z časti rozkladať už ureázou bachorovej steny na amoniak (Várady a kol. 1969, Houpt a Houpt 1968) a z časti prestupovať vo forme celej molekuly, ktorá sa rozloží v bachore pomocou mikrobálnej ureázy na amoniak. Prestup amoniaku z krvi možno vylúčiť, pretože jeho koncentrácia v krvi je oveľa nižšia ako v bachore a takýto priebeh proti koncentračnému gradientu by bol v rozpore s doterajšími experimentálnymi poznatkami. Zvýšenie množstva celkového dusíka i N — NH_3 v izolovanom bachore po jednohodinovej inkubácii bude do určitej miery spôsobené i prestupom aminokyselín, peptidov a pod. (Gžickij a Rozgoni 1960, Gžickij a Javonenko 1966, Várady a kol. 1968).

Zistené väčšie množstvo dusíka v izolovanom bachore (rozdiel hodnôt pred a po inkubácii) predstavuje tzv. netto pasáž dusíka, čo je v podstate rozdiel medzi sekretovaným a vstrebaným množstvom (Engelhardt 1972). O tom, že v čase vstrebávania dusíka prebieha súčasne i jeho sekrécia, svedčia naše predchádzajúce práce (Boďa a Várady 1966, Várady a kol. 1969) i experimenty Javonenka (1966), ktorý zistil, že ani pri vysokom obsahu dusíka v bachore sa neprerušuje prechod bielkovín z krvi do bachora. Doteraz nemožno s určitosťou povedať, či pred kŕmením, kedy prevláda pasáž N-látok z krvi do bachorového obsahu, prebieha aj opačný dej, t. j. ich vstrebávanie z bachora do krvi.

Výsledky našich experimentov i literárne údaje svedčia o tom, že obojstranná výmena dusíkatých metabolitov cez steny bachora je dôležitým faktorom, ktorý sa môže zúčastnovať na udržovaní približne stáleho chemického zloženia bachorového obsahu. Vďaka tomuto mechanizmu sa uskutočňujú vzájomné optimálne symbiotické vzťahy organizmu prežúvavca a mikroorganizmov nachádzajúcich sa v jeho predžalúdkoch.

Literatúra

ALIEV A. A., ALIEVA Z. M., 1965, Ruminogepatičeskaja cirkuljacija azota pri raznych istočnikach azotistogo pitanija životnych. Materialy III. vsesojuz. konf. po fiziol. i biochim. osnovam povyšenija produkt. s-ch. životnych. Borovsk.

BOĎA K., VÁRADY J., 1966, Sledovanie prestupu krvnej urey do bachora pomocou „izolovaného bachorčeka" pri normálnej výžive a hladovaní u oviec. Vet. Med. (Praha) 11 : 597-602.

ENGELHARDT V. W., 1972, Use of isotopes in studies on fluxes across the forestomach wall of ruminants. Isotope studies on the physiology of domestic animals. Proceedings of a symposium, Athens 20-24 March : 273 s.

GRAY V. F., PILGRIM A. F., 1956, Digestion of nitrogenous compounds. Nature 179 : 91-93.

GRIDIN M. J., KAPLAN V. A., KOROTUN J. D., 1964, Operacija izolovannogo rubcja u vivci. Fiziol. žurnal 4 : 560-562.

GŽICKIJ S. Z., JAVONENKO O. F., 1966, Pro funkciju rubcja velikoi rogatoi chudobi. Ukr. biochim. žurnal 6 : 633-637.

GŽICKIJ S. Z., ROZGONI I. I., 1960, Resorbcija i sekrecija aminokislot v perešlunkach velikoi rogatoi chudobi. Vistn. siľskogospod. nauki 9 : 79-80.

HOUPT T. R., HOUPT K. A., 1968, Urea nitrogen transfer across the rumen wall. Am. J. Physiol. 214 : 1296-1303.

JAVONENKO A. F., 1966, Fiziologičeskie i biochemičeskie osnovy povyšenija produktivnosti seľskochozjajstvennych životnych. Vyp. 2 M. „Kolos" Moskva.

KAPLAN V. A., BOJKO K. A., 1963, O pronicaemosti stenki rubca dlja ammiaka i močeviny. Materialy Vsesojuz. soveščanija po teoretičeskim osnovam povyšenija produkt. seľchoz. živ. Borovsk.

KURILOV N. V., KROTKOVA A. P., 1971, Fiziologija i biochimija piščevarenija žvačnych. „Kolos" Moskva.

LEIBHOLZ J., 1971, The absorption of amino acids from the rumen of the sheep. I. The loss of amino acids from solution placed in the washed rumen *in vivo*. Austr. J. Agric. Res. 22 : 639-645.

McDONALD I. W., 1948, The absorption of ammonia from the rumen of the sheep. Biochem. J. 42 : 584-587.

VÁRADY J., BOĎA K., HAVASSY I., BAJO M., 1969, Passage of endogenous urea nitrogen across the rumen wall in sheep before and after feeding. Physiol. bohemoslov. 18 : 23-27.

VÁRADY J., BOĎA K., HAVASSY I., TOMÁŠ J., BAJO M., 1968, Prechod aminodusíka do izolovaného bachorčeka oviec. Živočišná výroba 11—12 : 795-798.

ZÖLLNER N., BIRK P., 1958, Bestimmung des Blutammoniaks und ihre Ergebnisse bei Leberkrankheiten. Klin. Wschr. 36 : 570-574.

Došlo dne 23. 2. 1973

ВАРАДЫ Й., БОДЯ К., БАЙО М., САНИОВА М., ТОМАШ Н. (Институт физиологии сельскохозяйственных животных САН, Кошице, Чехословакия). **Процессы обмена азота между кровью и рубцовым содержанием у овец перед и после кормления.** Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 417-424, 1973.

На двух овцах с фистулой рубца и изолированным рубцом в восьми испытаниях исследовалось количество общего и аммиачного азота, содержащегося в жидкости рубца в изолированном рубце перед и после кормления. Рубцевые соки при каждом отборе (перед кормлением и 1, 2, 3, 4 и 5 часов после кормления) оставляли в изолированном рубце в течение 60 минут. Указанный метод позволил вычислить так наз. нетто пасаж азота, что составляет различие между количеством секреции и всасывания азота в изолированном рубце. Было установлено, что количество общего и аммиачного азота в изолированном рубце перед кормлением повышается, а после кормления понижается. Из этого вытекает, что перед кормлением преобладает переход азота из крови в рубец, после кормления наоборот — азот переходит из рубца в кровь. Была установлена положительная корреляция между различиями общего и аммиачного азота перед и после инкубации в изолированном рубце.

овцы; азотный метаболизм; рубцово-печеночный круговорот; секреция и всасывание азота в рубце; нетто перехода азота

VÁRADY J., BOĎA K., BAJO M., SZANYIOVÁ M., TOMÁŠ J. (Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Czechoslovakia). *The Nitrogen Exchange Processes between Blood and Rumen Content in Sheep before and after Feeding.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 417-424, 1973.

Eight trials were carried out with two sheep with rumen fistula and with isolated rumen to study the amounts of total and ammonia nitrogen in rumen liquor in an isolated rumen before and after feeding. In each collection (1, 2, 3, 4 and 5 hours after feeding), rumen liquor was applied to the isolated rumen and left there for 60 minutes. In this way the so-called netto nitrogen passage (difference between the amounts of nitrogen secreted and absorbed in isolated rumen) was calculated. It was found that the amounts of total and ammonia nitrogen increased in the isolated rumen before feeding and decreased after feeding. It follows from this that the passage of nitrogen from blood to rumen prevails before feeding and the absorption of nitrogen from rumen to blood prevails after feeding. A positive correlation was ascertained between the differences of total and ammonia nitrogen in the isolated rumen before and after incubation.

sheep; nitrogen metabolism; rumino-hepatal circulation; nitrogen secretion and absorption in rumen; netto nitrogen passage

VÁRADY J., BOĎA K., BAJO M., SZANYIOVÁ M., TOMÁŠ J. (Institut für Physiologie der Haustiere der Slowakischen Akademie der Wissenschaften). *Austauschprozesse des Stickstoffs zwischen dem Blut und Panseninhalt bei Schafen vor und nach der Fütterung.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 417-424, 1973.

Bei zwei Schafen mit Pansenfistel und mit dem isolierten Pansen wurde acht Versuchen die Menge von Gesamt- und Ammoniakstickstoff der Pansenflüßigkeit im isolierten Pansen vor und nach der Fütterung untersucht. Die Pansenflüßigkeit wurde bei jeder Entnahme (vor der Fütterung, 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden nach der Fütterung) in den isolierten Pansen appliziert und dort während 60 Minuten überlassen. Das angegebene Verfahren hat ermöglicht, die sogenannte Netto-Stickstoff-Passage zu numerieren, was eigentlich den Untersshied zwischen dem ab-

gesonderten und resorbierten Stickstoff im isolierten Pansen darstellt. Es wurde festgestellt, daß sich der Gehalt an Gesamt- und Ammoniakstickstoff im isolierten Pansen von der Fütterung erhöht und nach der Fütterung herabsetzt. Daraus ergibt sich, daß vor der Fütterung die Stickstoffpassage aus dem Blut in den Pansen überwiegt und nach der Fütterung umgekehrt — Stickstoff wird vom Pansen ins Blut resorbiert. Es wurde positive Korrelation zwischen den Unterschieden des Gesamt- und Ammoniakstickstoffs vor und nach der Inkubation im isolierten Pansen festgestellt.

Schafe; Stickstoffmetabolismus; Ruminal- und Hepatalkreislauf; Stickstoffabsondeung und -resorption im Pansen; Stickstoff-Netto-Passage

Adresa autorov:

MVDr. J. V á r a d y, CSc., prof. MVDr. K. B o ď a, DrSc., MVDr. M. B a j o, CSc., MVDr. M. S z a n y i o v á, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, 040 00 Košice, Palackého 36,
doc. MVDr. J. T o m á š, CSc., Vysoká škola veterinárska, katedra patologickej fyziológie, biochemie a toxikológie, 040 00 Košice, Komenského 71

OXYMYKOIN[R] SPOFA PLV. SOLUB. AD USUM VET. – TOXICITA, REZIDUA A KLINICKÉ HODNOCENÍ

M. Dvořák, B. Ševčík, F. Reichel, K. Plíšek

SPOFA, Výzkumné středisko pro veterinární léčiva, Jílové u Prahy

Ústav pro kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno

DVOŘÁK M., ŠEVČÍK B., REICHEL F., PLÍŠEK K. *Oxymykoin[R] SPOFA plv. solub. ad usum vet. – toxicita, rezidua a klinické hodnocení.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 425-430, 1973.

Stanovili jsme akutní toxicitu přípravku Oxymykoin *plv. solub. ad us. vet.* LD_{50} po jednorázové aplikaci u pětitýdenních kohoutků plemene LB je vyšší než 15 000 mg/kg, u myší je rovněž vyšší nežli 17 500 mg/kg ž. v. s mezemi spolehlivosti od 6625 mg do 12 150 mg. Rezidua OTC po pětidenní aplikaci 1 % roztoku Oxymykoinu vymizí ze svaloviny, jater a krve slepic do 48 hodin. Po této době jsme zjistili stopy OTC (0,75 μg OTC/g) pouze v ledvinách u 30 % případů. Rovněž ve vejcích u slepic se během pětidenní aplikace 0,5 % roztoku Oxymykoinu vyskytovala rezidua jen ojediněle a byla velice nízká (0,06–0,152 μg OTC/g). Při klinickém hodnocení ve veterinární praxi se léková forma preparátu velmi dobře osvědčila zejména při aplikaci ve velkochovech. Z 52 146 kusů nemocné drůbeže (CDR a k ní přidružené bakteriální infekce, inf. bronchitida, inf. sinusitida, inf. rhinitida aj.) bylo po aplikaci Oxymykoinu (obvykle 0,5 % koncentrace po dobu pěti dní) vyléčeno 50 797 kusů, tj. 97,5 %.

Oxymykoin[R] SPOFA *plv solub;* oxytetracyklin; toxicita; rezidua

U každého nově zaváděného léčiva je nezbytné stanovit jeho akutní toxicitu a rychlost vylučování z organismu po aplikaci doporučených dávek. Sledování reziduí účinných látek (nejčastěji antibiotik) v surovinách živočišného původu má zásadní význam pro ochranu zdraví lidí, neboť na tomto základě pak můžeme stanovit zcela bezpečné ochranné lhůty, během nichž nesmí být ošetřená zvířata použita pro jatečné účely.

Ve třech předchozích publikacích (Dvořák, Ševčík, Plíšek 1972a, b, 1973) jsme popsali dynamiku sérových hladin OTC u různých druhů hospodářských zvířat; v tomto sdělení uvádíme akutní toxicitu preparátu (pokus č. 1), rezidua ve vejcích a některých orgánech u slepic (pokusy č. 2 a č. 3) a stručný přehled výsledků klinického hodnocení.

MATERIÁL A METODY

Složení preparátu Oxymykoin *plv. solub. ad us. vet.* v %:

oxytetracyklin hydrochlorid (OTC HCL)		5,0
Septonex		1,0
vehikulum (sacharóza, kys. citrónová, solubilizační a antioxidační přísady)	*ad*	100,0

Pokus č. 1 — stanovení LD_{50}

Střední smrtnou dávku preparátu jsme stanovili u dvou věkových kategorií kohoutků plemene LB, a to u jednodenních o průměrné váze 42,3 g (38—47) a u pětitýdenních o průměrné váze 361 g (290—410). Rovněž jsme určili LD_{50} u bílých myší kmene H obojího pohlaví o průměrné váze 28,3 g (24—37).

Pro aplikaci pokusným zvířatům jsme připravili 30% a 60% roztok preparátu v destilované vodě. Roztoky jsme aplikovali perorálně, kuřatům gumovou sondou, myším kovovou sondou.

Kuřata v obou věkových kategoriích jsme rozdělili do šesti skupin po šesti zvířatech. Dávky jsme odstupňovali po 2500 mg na kg ž. v. od 2500 mg do 15 000 mg na kg ž. v.

U bílých myší jsme perorálně aplikovali stejné dávky a navíc ještě dávku 17 500 mg přípravku na kg ž. v. Rozmezí použitých dávek Oxymykoinu *plv. solub.* jsme stanovili na základě výsledků předběžných orientačních pokusů, vyšší dávky jsme aplikovali, vzhledem k velkému objemu, nadvakrát v rozmezí dvou hodin.

Výsledky pokusů jsme hodnotili grafickou probitlogaritmovou metodou podle Lichtfielda a Wilcoxona (1949).

Pokus č. 2 — stanovení reziduí OTC ve vejcích slepic

Dvacet zdravých slepic plemene LB ve stáří 10 měsíců, o průměrné váze 1,87 kg (1,58—2,25) a v 40% snášce jsme rozdělili do pokusné (15 ks) a kontrolní (5 ks) skupiny. Slepicím v pokusné skupině jsme aplikovali *ad libitum* 0,5% roztok Oxymykoin *plv. solub.* v pitné vodě po dobu 120 hodin.

Vejce na stanovení OTC jsme odebírali od obou skupin před aplikací, během pokusu a tři dny po skončení podávání. Z vajec snesených v pokusné skupině jsme denně vyšetřovali na obsah OTC šest kusů, z kontrolní dva kusy.

Ke stanovení OTC jsme použili difúzní plotnovou metodu podle Grova, Randalla (1955) v modifikaci podle Vyhnálka (1972). Vaječnou melanž (směs bílku i žloutku) jsme homogenizovali s citrát-acetonovým pufrem (0,1 M roztok citranu draselného — 35 obj. dílů, aceton — 35, dest. voda — 30, pH — upraveno na 5,2) v poměru 1+3 a pipetovali do důlků v agarové půdě. Dobrou citlivost prokázal testovací kmen *B. cereus* PCI 213.

Slepice byly umístěny v boxu při teplotě 12 až 18 °C a relativní vlhkosti do 75 % a krmeny sypkou směsí N bez VAD. Roztok Oxymykoin *plv. solub.* byl připravován denně čerstvý.

Pokus č. 3 — stanovení reziduí OTC v orgánech u slepic

Klinicky zdravé slepice plemene LB ve stáří 14 měsíců o průměrné váze 1,93 kg (1,80—2,10) jsme rozdělili na pokusnou (30 kusů) a kontrolní (10 kusů) skupinu.

Slepicím v pokusné skupině jsme aplikovali 1% roztok Oxymykoinu *plv. solub* v pitné vodě po dobu 120 hodin.

Ve 48., 96. a 144. hodině po skončení aplikace jsme usmrtili 10 slepic z pokusné skupiny a odebrali vzorky krve, jater, ledvin a svaloviny k vyšetření na obsah OTC. Stejným způsobem jsme vyšetřili ve shodných intervalech 10 slepic z kontrolní skupiny.

Slepice byly umístěny v boxech při teplotě 10 až 18 °C a relativní vlhkosti do 75 % a krmeny kompletní směsí N (složení v procentech podle receptury platné v roce 1972: 17,0 — BK SK, 73,8 — kukuřice, pšenice, ječmen, čirok, 3,0 — senná moučka, 4,0 — mikromletý krmný vápenec, 0,2 — krmná sůl, 2,0 — minerální krmná přísada 2; obsah doplňkových látek v 1 kg směsi: CTC

— 20,4 mg, vitamín A — 8160 m. j., D_3 — 918 m. j., B_2 — 3,1 mg, Kurasan — 127,5 mg).

Ke stanovení OTC v krevním séru a v orgánech jsme použili difúzní plotnovou metodu podle Grova a Randalla (1955) s *B. cereus* ATCC 9634 jako s testovacím mikroorganismem. Při zpracování vzorků z orgánů jsme 1 g tkáně homogenizovali se 4 ml fosfátového pufru pH 4,5. Tento poměr doporučuje Wright (1970) ke snížení vazby OTC na tkáňové komponenty.

Klinické hodnocení Oxymykoinu *plv. solub ad us. vet.*

Metodiku klinického hodnocení preparátu podrobně uvádějí autoři Ševčík a kol. (1972).

VÝSLEDKY

V pokuse č. 1 jsme zjistili, že preparát má značnou terapeutickou šíři. LD_{50} u pětitýdenních kohoutků po jednorázové aplikaci je vyšší než 15 000 mg Oxymykoinu *plv. solub.* na kg ž. v. Při této dávce neuhynulo žádné kuře. Stejně tak bílé myšky přežily dávku 17 500 mg na kg ž. v. Zvyšování dávek vzhledem k velkému objemu maximálně koncentrovaných roztoků bylo technicky neproveditelné. Pouze u jednodenních kohoutků byla stanovena LD_{50} 9000 mg preparátu na kg ž. v. s mezemi spolehlivosti od 6625 mg do 12 150 mg na kg ž. v.

V pokuse č. 2 jsme vyšetřili 50 vajec z pokusné skupiny a 18 vajec z kontrolní skupiny. Ve vejcích od slepic v kontrolní skupině jsme nezjistili stopy OTC. Výsledky vyšetření vajec z pokusné skupiny uvádíme v tab. I. Průměrná spotřeba roztoku Oxymykoinu *plv. solub.* činila 258 ml na kus a den, což odpovídá dávce 64,5 mg OTC HCl na kus a den nebo 34,4 mg OTC HCl na kg ž. v. na den.

Výsledky pokusu č. 3 uvádíme v tab. II. Spotřeba roztoku byla 270 ml na kus a den, což odpovídá dávce 135 mg OTC HCl na kus a den nebo 69,9 mg OTC HCl na kg ž. v. na den. Ve vzorcích orgánů slepic z kontrolní skupiny jsme zjistili stopy inhibičních látek vytvářejících malé zóny a imitujících obsah OTC v množství cca 0,3 μg OTC na g tkáně (v krevním séru cca 0,17 μg OTC na ml).

I. Výsledky pokusu č. 2 — Rezidua OTC ve vejcích slepic při pětidenní aplikaci 0,5 % roztoku Oxymykoin *plv. solub. ad usum vet.* v pitné vodě (údaje v μg/g vaječné melanže)

Vejce	Dny pokusu								
	před aplikací	aplikace preparátu					dny po skončení aplikace		
		1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.
1	—	—	0,116	0,076	0,068	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	0,152	0,060	—	0,060	—	—	—
4	—	—	—	—	0,068	—	—	—	—
5	—	—	—	—	0,060	—	—	—	—
6	—	—	—	0,060	0,072	—	—	—	—
Průměr (jen pozitivní nálezy)	—	—	0,134	0,065	0,067	0,060	—	—	—

II. Výsledky pokusu č. 3 — Rezidua OTC ve tkáních kuřat po aplikaci 1% roztoku Oxymykoin *plv. solub. ad usum vet.* (údaje v μg/g (ml) čerstvé tkáně)

Orgány	Počet vzorků	Počet hodin po skončení aplikace	
		48	96
		$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
Krev	10	0,00	0,0
Svalovina	10	0,00	0,0
Ledviny	10	0,75 ± 0,151*	0,0
Játra	10	0,00	0,0

* = průměr ze tří pozitivních nálezů, u ostatních sedmi vzorků OTC nezjištěn

Při klinickém hodnocení byl Oxymykoin *plv. solub.* ověřován na 12 terénních veterinárních pracovištích u drůbeže, na jednom objektu u telat a na dalším pracovišti u prasat, norků a králíků. U drůbeže byl preparát použit především při onemocnění dýchacích orgánů (sekundární infekce při CRD, inf. bronchitida, inf. sinusitida, inf. rhinitida). Celkem bylo léčeno 52 146 kusů drůbeže různých věkových kategorií, z toho bylo vyléčeno 50 797 ks, tj. 97,4 %. Přípravek se lépe uplatnil při léčebném než preventivním podání, snížily se přímé i nepřímé ztráty, zvýšila se užitkovost. Léková forma preparátu plně vyhovovala podmínkám aplikace ve velkochovech. Orientačně byl přípravek klinicky hodnocen u prasat (gastroenteritida, bronchitida), norků (enteritida) a králíků (rhinitida) vesměs s dobrými výsledky. Podrobné výsledky klinického hodnocení uvádějí Ševčík a kol. (1972).

DISKUSE

Výsledky pokusu č. 1 — stanovení akutní toxicity — vcelku potvrdily očekávanou skutečnost, že Oxymykoin *plv. solub.* má podobně jako jiné antibiotické preparáty dostatečnou terapeutickou šíři a je prakticky netoxický.

V pokuse č. 2 jsme sledovali výskyt reziduí OTC ve vejcích u slepic po aplikaci 0,5% roztoku Oxymykoin *plv. solub.* Poměrně nízká rezidua (0,060—0,125 μg OTC/g) jsme zjistili během aplikace (od 2. dne podávání), a to u 10 vajec ze 30 vyšetřovaných, tedy ve 33 % případů. Ani v jednom případě nepřesáhla zjištěná rezidua hodnotu 0,3 μg/g.

Naše nálezy se částečně shodují s výsledky Vyhnálka (1972), který po pětidenním podání 0,5% roztoku Oxymykoinu *plv. solub.* slepicím ve slabé a nepravidelné snášce zjistil nízká rezidua OTC od čtvrtého dne aplikace do 72. hodiny po jejím skončení u 29,4 % vajec. Pouze v jednom případě obsah OTC přesáhl hodnotu 0,3 μg na g. V pokuse s 1% koncentrací Oxymykoin *plv. solub.* stanovil OTC od třetího dne aplikace do 48. hodiny po skončení podání u 88 % vajec. Ve 40,9 % pozitivních nálezů byla zjištěna rezidua vyšší než 0,3 μg OTC/g.

Při stanovení stopových množství OTC ve vejcích je velmi důležité použití správné metodiky, a to zejména vhodného pufru. Jestliže jsme míchali vaječnou melanž s fosfátovým pufrem pH 4,5 v poměru 1+2 (postup obvyklý při zjišťování OTC v krevním séru), nepodařilo se nám prokázat rezidua OTC ve vejcích během pětidenní aplikace 0,5% i 1,0% roztoku Oxymykoin *plv. solub.*

Oxytetracyklin se z organismu slepic vylučuje poměrně rychle. V pokuse č. 3 jsme ve 48. hodině po skončení aplikace nalezli rezidua OTC pouze v ledvinách (3 vzorky z 10). To svědčí o intenzívní eliminaci OTC z organismu ledvinami. V 96. a 144. hodině jsme rezidua OTC ve vyšetřovaných orgánech nenalezli.

Jak již bylo dříve uvedeno, zjistili jsme ve vzorcích orgánů slepic z kontrolní skupiny stopy inhibičních látek, vytvářejících malé zóny a imitujících obsah OTC v množství cca 0,3 μg/g tkáně. Jednalo se patrně o látky pocházející z krmiva, nejspíše CTC. Pokud byly zjištěny zóny stejné velikosti v orgánech slepic z pokusné skupiny v některém ze tří odběrů, byl nález OTC hodnocen jako negativní.

Z výsledků pokusu vyplynulo, že po pětidenní aplikaci 1% roztoku Oxymykoinu téměř vymizela rezidua do 48. hodiny po aplikaci.

Cílem klinického hodnocení bylo především ověření vlastností lékové formy v provozních podmínkách, protože účinnost oxytetracyklinu na nejčastěji se vyskytující bakteriální zárodky provázející virová onemocnění u drůbeže je obecně známá. Někteří autoři (Bajdevljatov, Kovalskij 1966) uvádějí i částečné přímé působení OTC na *Mycoplasma gallisepticum*.

Vhodné vlastnosti Oxymykoin *plv. solub.* při aplikaci ve velkochovech i účinek OTC na snižování přímých i nepřímých ztrát při chronických chorobách dýchacích orgánů drůbeže byly při klinickém hodnocení preparátu plně potvrzeny.

Literatura

BAJDEVLJATOV A. B., KOVALSKIJ E. I., 1966, Ocenka dějstvija antibiotikov na vozbuditelja respiratornogo mikoplasmosa ptic. Veterinarija 43 : 28-32.

DVOŘÁK M., ŠEVČÍK B., PLÍŠEK K., 1972a, Hladiny oxytetracyklinu v krevním séru u kuřat po aplikaci Oxymykoin *plv. solub. ad usum vet.* Vet. Med. (Praha) 5 : 265-272.

DVOŘÁK M., ŠEVČÍK B., PLÍŠEK K., 1972b, Hladiny oxytetracyklinu v krevním séru u slepic, krůt a holubů po aplikaci Oxymykoin^R SPOFA *plv. solub. ad usum vet.* Vet. Med. (Praha) 9 : 569-575.

DVOŘÁK M., ŠEVČÍK B., PLÍŠEK K., 1973, Hladiny oxytetracyklinu v krevním séru u telat, selat a psů po aplikaci Oxymykoin^R SPOFA *plv. solub. ad usum vet.* Vet. Med. (Praha) 2 : 75-80.

GROVE D. C., RANDALL W. A., 1955, Assay methods of antibiotics. Medical Encyclopedia, Inc. New York : 1-238.

LITCHFIELD J. T., WILCOXON F., 1949, A simplified method of evaluating deseffect experiments. J. Pharm. Exp. Therap. 96 : 99.

ŠEVČÍK B., REICHEL F., VOSTOUPAL B., DVOŘÁK M., PLÍŠEK K., 1972, Oxymykoin *plv. solub.*, léková forma oxytetracyklinu pro aplikaci ve velkochovech. Veterinaria SPOFA 14 : 133-147.

VYHNÁLEK J., 1972, Rezidua OTC ve vejcích. Referát na VII. rozšířeném zasedání katedry farmakologie, VŠV Brno.

WRIGHT W. W., 1970, Detection of Antibiotics in Animal Tissues. Journal of the AOAC 53 : 219-223.

Došlo dne 26. 1. 1973

ДВОРЖАК М., ШЕВЧИК Б., РАЙХЕЛ Ф., ПЛИШЕК К. (СПОФА, Научно-исследовательский центр ветеринарных лекарств, Йилове-у-Праги; Институт контроля над ветеринарными биопрепаратами и лекарствами, Брно, Чехословакия). *Oxymykoin^R SPOFA plv. solub. ad usum vet.* — **токсичность, остатки и клиническая оценка**). Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 425-430, 1973.

Определяли острую токсичность препарата Oxymykoin *plv. solub. ad us. vet.* LD_{50} после однократной дачи препарата 5-дневным петушкам ЛБ превышает 15 000 мг/кг, у мышей он превышает 17 500 мг/кг ж. в. с лимитами надежности от 6625 мг до 12 150 мг. После 5-дневной дачи 1% раствора Оксимикоина остатки OTC исчезают из мышц, печени

и крови кур сроком до 48 час. По истечению этого срока следы OTC (0,75 μг OTC/г) обнаружены лишь в почках у 30 % случаев. Также в куриных яйцах в течение 5-дневной дачи 0,5 % раствора Оксимикоина остатки встречались лишь в единичных случаях и были весьма малыми (0,06—0,152 μг OTC/г). При клинической оценке в ветпрактике медикаментная форма препарата отлично себя оправдала, главным образом, в промышленном разведении. Из 52 146 гол. больной птицы (CRD и сопряженные бактериальные инфекции: *inf. bronchitis, inf. sinusitis, inf. rhinitis* после дачи Оксимикоина (обычно 0,5% концентрации в течение 5 дней) было вылечено 50 797 гол. т. е. 97,5 %.

Oxymykoin[R] SPOFA *plv. solub.*; окситетрациклин; токсичность; остатки

DVOŘÁK M., ŠEVČÍK B., REICHEL F., PLÍŠEK K. (SPOFA Research Center of Veterinary Medicaments, Jílové near Praha, Institute for Control of Veterinary Biopreparations and Medicaments, Brno, Cezchoslovakia). *Oxymykoin[R] SPOFA plv. solub. ad usum vet. — Toxicity, Residua and Clinical Evaluation.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 425-430, 1973.

Acute toxicity of the preparation Oxymykoin *plv. solub. ad us. vet.* was determined. After one-time application in five weeks old cockerels of the breed WL LD_{50} is higher than 15,000 mg/kg, in mice it is also higher than 17,500 mg/kg live weight, confidence limits being from 6625 mg to 12,150 mg. OTC residua after five days application of a 1 per cent solution of Oxymykoin disappear from the musculature, the liver and the blood of hens within 48 hours. After this time OTC traces (0.75 μg OTC/g) were found only in the kidneys in 30 % of the cases. Also in eggs residua occurred only sporadically in the course of a five days application of a 0,5 per cent solution of Oxymykoin to hens and they were very low (0,06—0.152 μg OTC/g). At a clinical evaluation in veterinary practice the medicament form of the preparation proved very suitable especially in an application in large-scale breeds. Out of 52,146 birds of ill poultry (CRD and the associated infections, inf. bronchitis, inf. sinusitis, inf. rhinitis and other) 50,797 birds, i. e. 97.5 % recorved after the application of Oxymykoin (usually a concentration of 0.5 per cent for a period of 5 days).

Oxymykoin[R] SPOFA *plv. solub.*; oxytetracycline; toxicity; residua

DVOŘÁK M., ŠEVČÍK B., REICHEL F., PLÍŠEK K. (SPOFA, Forschungszentrum für Veterinärheilmittel, Jílové bei Praha, Institut für Kontrolle der Veterinärbiopräparate und Heilmittel, Brno, Tschechoslowakei). *Oxymykoin[R] Spofa plv. solub. ad usum vet. — Toxizität, Überreste und klinische Beurteilung.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 425-430, 1973.

Es wurde die akute Toxizität des Präparats Oxymykoin *plv. solub. ad us. vet.* festgestellt. Bei einer einmaligen Applikation bei fünf Wochen alten Junghähnen der Rasse WL ist LD_{50} höher als 15.000 mg/kg, bei Mäusen ebenso höher als 17.500 mg/kg Lebendgewicht mit Verläßlichkeitsgrenzen von 6625 mg bis 12.150 mg. Nach einer fünftägigen Applikation einer 1%-igen Oxymykoinlösung verschwinden die OTC-Überreste aus der Muskulatur, der Leber und dem Blut der Hennen innerhalb von 48 Stunden. Nach dieser Zeit haben wir OTC-Spuren (0,75 μg OTC/g) nur in den Nieren bei 30 % der Fälle festgestellt. Auch in den Eiern trafen bei Hennen im Laufe einer fünftägigen Applikation einer 0,5%-igen Oxymykoinlösung Überreste nur selten auf und waren sehr niedrig (0,06—0,152 μg OTC/g). Bei der klinischen Beurteilung in der Veterinärpraxis bewährte sich die Heilmittelform des Präparats sehr gut insbesondere bei Applikation in Großzuchten. Von 52.146 Vögeln des kranken Geflügels (CDR und die hinzutretenden Bakterialinfektionen, *Inf. bronchitis, Inf. sinusitis, Inf. rhinitis* u. a.) wurden nach der Oxymykoinapplikation (gewöhnlich eine 0,5 %-ige Konzentration für die Dauer von 5 Tagen) 50.797 Vögel, d. i. 97,5 % geheilt.

Oxymykoin[R] SPOFA *plv. solub.*; Oxytetracyklin; Toxizität; Überreste

---

Adresa autorů:

RNDr. M. Dvořák, doc. MVDr. B. Ševčík, CSc., MVDr. F. Reichel, SPOFA, Výzkumné středisko pro veterinární léčiva, 254 01 Jílové u Prahy,
MVDr. K. Plíšek, Ústav pro kontrolu veter. biopreparátů a léčiv, 600 00 Brno

---

KLINICKÉ OVĚŘENÍ ÚČINNOSTI PŘÍPRAVKU LINCO-SPECTINU 100 K TLUMENÍ CRD U KUŘAT

J. Škaloud, J. Vyhnálek, J. Vlasák, J. Vlasáková

Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno
Podnik šlechtění drůbeže, Dobřenice

ŠKALOUD J., VYHNÁLEK J., VLASÁK J., VLASÁKOVÁ J. *Klinické ověření účinnosti přípravku Linco-Spectinu 100 k tlumení CRD u kuřat.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 431-440, 1973.

V chovu se soustavně laboratorně i klinicky prokazovanou mykoplazmózou jsme u 5668 kuřat plemene LB-Jubilant 72 klinicky ověřili účinnost profylaktických dávek Linco-Spectinu 100 v porovnání s účinností antibiotika Spectamu *pro inj.* a s neošetřenou skupinou. Jako podklad pro závěrečné hodnocení účinnosti preparátu byla denní kontrola úhynů spolu s vyhodnocením patologicko-anatomického nálezu. Současně se kontrolovala váha kuřat a dělalo se sérologické, histologické a mikrobiologické vyšetření. V průběhu pokusu prokázal ověřovaný preparát Linco-Spectin 100 lepší výsledky, než u nás běžně používaný Spectam *pro inj.* V období do 44. dne stáří nebyl nižší počet uhynulých kuřat u skupiny I (Linco-Spectin 100) proti skupině II (Spectan) statisticky významný. Od 44. dne stáří tento rozdíl byl již statisticky vysoce významný. V průběhu celého pokusu rozdíl v úhynech mezi skupinou I a skupinou III (kontrola) byl vysoce statisticky významný. Patologicko-anatomické nálezy u uhynulých kuřat, charakterizující mykoplazmózu, se u skupiny ošetřené Linco-Spectinem 100 v 5. až 9. týdnu pohybovaly kolem 20 %, u skupiny spectamované dosáhly 60 % a u kontrolní skupiny 80 %. Kontrolou průměrné váhy nebyly zjištěny podstatné rozdíly mezi jednotlivými skupinami. U sérologického vyšetření Gallitestem bylo u skupiny kontrolní nejvíce pozitivních reakcí, dále pak u skupiny spectamované, zatímco u skupiny ošetřené Linco-Spectinem 100 nedošlo k pozitivní reakci.

kuřata; mykoplazmóza; koli-infekce; Lincomycin; Spectinomycin; aplikace ve vodě

Chronická respiratorní onemocnění — zejména mykoplazmóza a koli-infekce — jsou jedna ze závažných onemocnění u drůbeže v intenzívních chovech, ve kterých způsobují vážné ekonomické ztráty. Projevují se nejen v samotném chovu, nýbrž i v odchovu, kde dochází k značným úhynům a celkovému snížení příjmu krmiva, což má za následek nižší váhové přírůstky a zpomalení růstu (Jurajda 1971). Gerlachová (1968) předpokládá, že v NSR je 70 až 90 % chovů promořených *M. gallisepticum*; v řadě zemí bude situace obdobná. U nás se o problémech a nezbytnosti vypracování plánu na ozdravení velkochovů drůbeže od mykoplazmózy zmiňuje Sýkora (1971) a Hložánek (1971).

Jedním z nejúčinnějších postupů, jak ozdravit chovy a tím i snížit ztráty, je preventivní podávání účinných látek v odchovu.

V našem státě se pro nedostatek vhodných domácích léčiv používají převážně zahraniční preparáty, jako je Spectam *pro inj.* — s účinnou látkou specti-

nomycinem (fa Abbott), s nímž dobrých výsledků dosáhli Zolli a Polewaczyk (1970), dále Tylan - tylosin tartrate (fa Elanco) a Gallimycin - erytromycin-thiocyanát (fa Abbott). Gerlachová (1968), Bertoldini a kol. (1969) a Leclerc (1971) považují tylosin za nejúčinnější antibiotikum proti *M. gallisepticum*. Tylosin má však poměrně úzké antibiotické spektrum, takže převážná část sekundární mikoflóry není postihována. Je proto nutná včasná aplikace terapeutika, dokud není ještě sekundární mikroflóra v převaze. Účinnost erytromycinu proti *M. gallisepticum* je udávána v literatuře rozdílně, jak uvádí Jurajda (1971). V zahraničí se dále používá celé řady preparátů, jako např. Spiramycin, u kterého prokázali velmi dobré výsledky Gerlachová (1968), Lukas a Inglis (1970); preparát Furaltadon je účinnější než tylosin (Matzer 1969); lepších výsledků než s tylosinem dosáhl také Marca a kol. (1970) s thiamfenikolem.

Jedním z nejnovějších preparátů je Linco-Spectin 100, vyráběný firmou Upjohn. Je to ve vodě rozpustné antibiotikum se širokým antibakteriálním spektrem, speciálně účinné na *M. gallisepticum*. Je určeno pro podávání v pitné vodě k prevenci a léčbě mykoplazmózy a koli-infekcí u kuřat v odchovu. Bylo s ním, jako s nejvhodnější kombinací antibiotik lincomycinu à 33,3 g a spectinomycinu à 66,7 g, dosaženo v zahraničí velmi dobrých výsledků (Hamdy a Blanchard 1969 a Hamdy 1970).

Úkolem naší práce bylo ověření účinnosti tohoto preparátu v našich podmínkách.

METODA

Účinnost profylaktických dávek Linco-Spectinu 100 byla klinicky ověřena v srpnu až říjnu v PŠD Dobřenice u Hradce Králové a porovnán s účinností u nás běžně používaného antibiotika Spectam *pro inj.* (fa Abbott) a s neošetřenou skupinou. Do vlastního pokusu bylo zahrnuto 5668 jednodenních kuřat plemene LB-Jubilant 72; kuřata byla rozdělena do následujících tří skupin:

- první skupině (I) — 1991 kuře — byl podáván Linco-Spectin po prvních pět dnů života a opětovně po dobu dvou dnů ve stáří 30 dnů v dávce 0,55 g celkové antibiotické aktivity na 1 l pitné vody,
- druhé skupině (II) — 1984 kuřata — byl aplikován Spectam inj. à 5 mg/1 ml v dávce 0,2 ml pro jedno kuře,
- třetí skupina (III) — 1693 kuřata — sloužila jako neléčená kontrola.

Všechny tři skupiny byly umístěny v hale typu Hustopeč NHKG na ploše 480 m^2 a u všech byly dodrženy v průběhu celého pokusu stejné zoohygienické podmínky.

Jako podklad pro závěrečné hodnocení účinnosti preparátu byla denní kontrola úhynu spolu s vyhodnocením patologicko-anatomického nálezu. Současně se kontrolovala váha ve stáří 28 a 58 dnů a sérologicky se vyšetřovalo pomocí Gallitestu na přítomnost protilátek proti *M. gallisepticum* ve stáří 28, 63 a 84 dny. Náhodně vybraná kuřata byla mikrobiologicky a histologicky vyšetřena.

Dále byla sledována rozpustnost, celková spotřeba preparátu a snášenlivost u kuřat.

Všem kuřatům byla v průběhu pokusu podána podle vakcinačního programu VB_1 (v 10 dnech stáří) a Neobrom I (ve stáří 34 dnů). Statistickou významnost dosažených výsledků, tj. rozdíl v úhynech mezi jednotlivými skupinami, jsme hodnotili podle χ^2.

I. Vyhodnocení patologicko-anatomického nálezu

Časové období	Počet pitvaných kusů	Skupina I (Linco-Spectin)	Počet pitvaných kusů	Skupina II (Spectam)	Počet pitvaných kusů	Skupina III (kontrola)
1. týden	32	snížená biologická hodnota, peritonitida, vývojové defekce	28	snížená biologická hodnota, peritonitida, vývojové defekce	52	snížená biologická hodnota, peritonitida, vývojové defekce
2. týden	6	nevstřebané žloutkové váčky, peritonitida, udušení, utopení	15	nevstřebané žloutkové váčky, peritonitida, udušení, utopení	19	nevstřebané žloutkové váčky, peritonitida, udušení, utopení
3. týden	3	zranění, udušení	9	celková porucha výměny látkové, enteritida, zranění	6	celková porucha výměny látkové, enteritida, zranění
4. týden	1	zranění	0		0	
5. týden	0		3	enteritida, aerosacculitida, zranění	4	enteritida, aerosacculitida, zranění
6. týden	5	enteritida, zranění	2	enteritida, aerosacculitida, perikarditida	3	enteritida, aerosacculitida, degenerace jater
7. týden	4	enteritida, aerosacculitida, zranění	6	enteritida, aerosacculitida, perikarditida	4	enteritida, aerosacculitida, perikarditida
8. týden	33	enteritis-kokcidióza, aerosacculitida, perikarditida	89	enteritis-kokcidióza, aerosacculitida, perikarditida, perihepatitida	61	enteritis-kokcidióza, aerosacculitida, perikarditida, perihepatitida
9. týden	25	enteritida, aerosacculitida, perikarditida, perihepatitida	48	enteritida, aerosacculitida, perikarditida, perihepatitida	37	enteritida, aerosacculitida, perikarditida, perihepatitida

II. Statistické vyhodnocení úhynů kuřat

Skupina	Počet kusů	Úhyn za											
		10 dnů		20 dnů		34 dny		44 dny		54 dny		64 dny	
		ks	%	ks	%	ks	%	ks	%	ks	%	ks	%
I (Linco-Spectin)	1991	37	1,90	41	2,05	42	2,10	47	2,36	73	3,66	109	5,47
II (Spectam)	1984	36	1,81	53	2,66	56	2,81	58	2,91	111	5,58	201	10,12
III (kontrola)	1693	65	3,84	76	4,49	81	4,78	85	5,01	129	7,61	186	11,07
I — III		$P < 0,01$		$P < 0,01$		$P < 0,01$		$P < 0,01$		$P < 0,01$		$P < 0,01$	
I — II		$P > 0,10$		$P > 0,10$		$P > 0,10$		$P > 0,10$		$P < 0,01$		$P < 0,01$	
II — III		$P < 0,01$		$P < 0,05$		$P < 0,05$		$P < 0,05$		$P > 0,10$		$P > 0,10$	

VÝSLEDKY

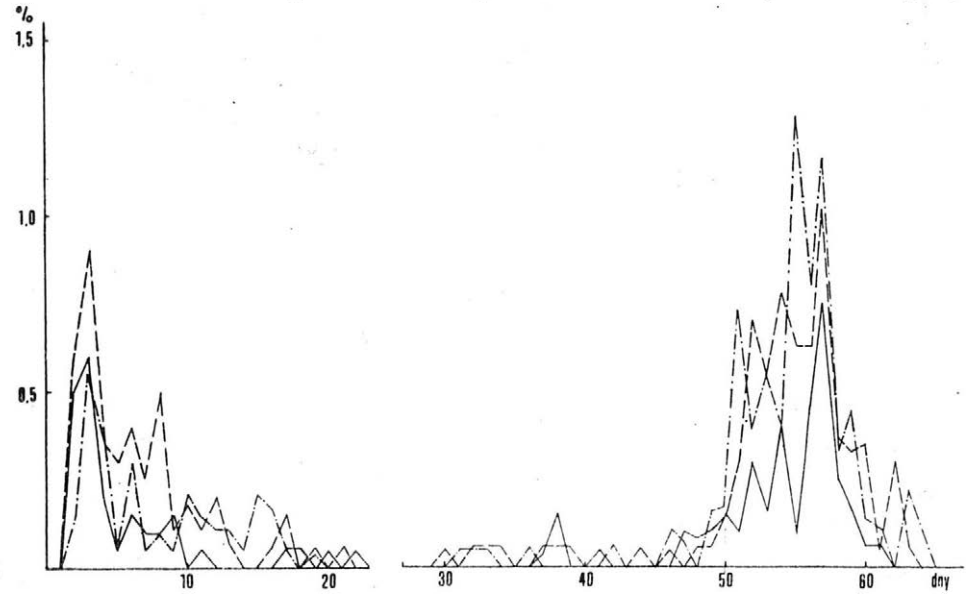
Za základní hodnocení efektivnosti léčiva jsme považovali denní úhyn kuřat v léčených skupinách v porovnání se skupinou kontrolní. Výsledky jsou uvedeny na obr. 1.

U kuřat ve stáří 23 dny došlo k vysokému úhynu; během noci se kuřata umačkala a udusila v důsledku blíže nezjištěného vnějšího podnětu. Při konečném hodnocení úhyny za tento den a za následující tři dny nebyly brány v úvahu. V žádném případě neměl tento úhyn vztah k pokusu.

Všechna kuřata uhynulá během pokusu byla pitvána a patologicko-anatomické nálezy jsou uvedeny v tab. I.

Desátý týden k úhynu téměř nedocházelo, ale klinicky se ještě projevovaly u skupiny kontrolní a spectamované ve zvýšené míře příznaky dýchacích obtíží, skleslost a ospalost. U skupiny ošetřené Linco-Spectinem nebyly již klinické příznaky onemocnění pozorovány.

Při srovnání počtů úhynů za období prvních deseti dnů se projevil Spectam o něco málo účinnější než Linco-Spectin, rozdíl však nebyl statisticky vý-

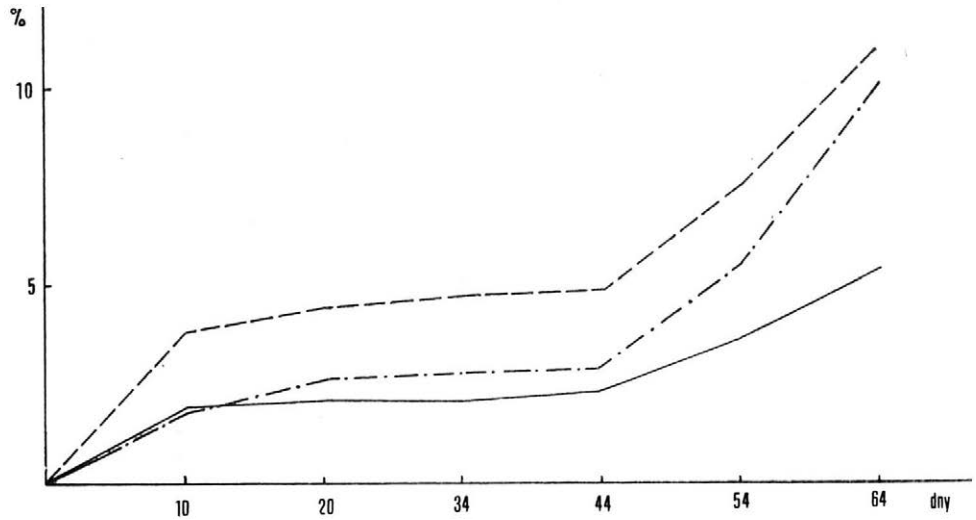


1. Denní úhyny kuřat, vyjádřené v procentech k počátečnímu stavu
——— Linco-Spectin
– – – kontrola
—·—· Spectam

III. Kontrola průměrné váhy

Skupina	Počet kusů	Průměrná váha v g		Přírůstek na kus v g
		28 dnů	58 dnů	
I (Linco-Spectin)	30	231	638	407
II (Spectam)	30	232	629	397
III (kontrola)	30	230	634	404

znamný ($P > 0{,}10$). V období od 10 do 44 dnů byl počet uhynulých kuřat u skupin I (Linco-Spectin) nižší než u skupiny II (Spectam), ale rozdíl nebyl opět statisticky významný. Od 44. dne stáří se projevil výrazný rozdíl v úhynu mezi oběma skupinami ve prospěch Linco-Spectinu, který se po vyhodnocení χ^2 ukázal jako statisticky vysoce významný ($P < 0{,}01$). V průběhu celého pokusu rozdíl v úhynech mezi skupinou I (Linco-Spectin) a skupinou III (kontrola) je vysoce statisticky významný ($P < 0{,}01$), mezi skupinou II (Spectam) a skupinou III (kontrola) je v období prvních deseti dnů vysoce statisticky významný ($P < 0{,}01$), v období od 20. do 44. dne je statisticky významný ($P < 0{,}05$)



2. Rozdíly v úhynech v desetidenních intervalech, vyjádřené v procentech k počátečnímu stavu
——— Linco-Spectin
– – – kontrola
—·—· Spectam

IV. Sérologické vyšetření Gallitestem

Stáří ve dnech	Skupina	Počet vyšetřených kusů	Výsledky	
			+	±
28 dnů	I (Linco-Spectin)	30	–	–
	II (Spectam)	30	–	–
	III (kontrola)	30	–	1
63 dny	I (Linco-Spectin)	30	–	1
	II (Spectam)	30	1	2
	III (kontrola)	30	3	3
84 dny	I (Linco-Spectin)	34	–	2
	II (Spectam)	8	2	–
	III (kontrola)	34	8	1

a od 44. dne je rozdíl statisticky nevýznamný ($P > 0{,}10$). Rozdíly v úhynech u jednotlivých skupin, vyjádřené v procentech k počátečnímu stavu v desetidenních intervalech, jsou uvedeny na obr. 2.

Statistické vyhodnocení rozdílů v úhynech kuřat v desetidenních intervalech je zahrnuto v tab. II.

Kontrolou průměrné váhy 30 kuřat ve stáří 28 a 58 dní nebyly zjištěny podstatné rozdíly mezi jednotlivými skupinami (tab. III).

Sérologické vyšetření kuřat ve stáří 28, 63 a 84 dnů pomocí Gallitestu ukázalo rozdíly v tvorbě protilátek proti mykoplazmóze u jednotlivých skupin. Nejvíce prozitivních reakcí bylo u skupiny kontrolní, dále pak u skupiny spectamované, zatímco u skupiny ošetřené Linco-Spectinem nedošlo k žádné pozitivní reakci v průběhu pokusu. Výsledky sérologického vyšetření jsou zpracovány v tab. IV.

29 kuřat náhodně vybraných bylo histologicky a mikrobiologicky vyšetřeno. Histologickým vyšetřením 13 kuřat vybraných ze tří skupin ve stáří 30 dnů byla u všech prokazována suspektně mykoplazmóza. U čtyř kusů skupiny I (Linco-Spectin) a u čtyř kusů skupiny III (kontrola) ve stáří 45 dnů byla diagnostikována mykoplazmóza a u osmi kuřat skupiny II (Spectan) byla konstatována mykoplazmóza suspektně.

Při mikrobiologickém vyšetření se nepodařilo ze sliznice trachee *M. gallisepticum* vykultivovat pro velké množství *E. coli*.

Sledováním rozpustnosti, celkové spotřeby a snášenlivosti preparátu bylo zjištěno, že zkoušené antibiotikum Linco-Spectin 100 se velice dobře rozpouští v pitné vodě, což umožňuje jeho použití i v automatických napáječkách. Kuřata přijímala medikovanou vodu velmi dobře, bez jakýchkoliv vedlejších negativních příznaků a celková spotřeba Linco-Spectinu 100 v preventivní dávce pro 1991 kuře činila 209 g celkové antibiotické aktivity, přičemž jedno originální balení obsahuje 100 g celkové antibiotické aktivity.

DISKUSE

V chovu, ve kterém v předchozím období byla mykoplazmóza klinicky i laboratorně soustavně prokazována, jsme dosáhli při její prevenci u kuřat lepších výsledků s Linco-Spectinem 100 než se Spectamem. Získané výsledky jsou ve shodě s výsledky, kterých dosáhli s Linco-Spectinem 100 Hamdy a Blanchard (1969) a Hamdy (1970) ve svých pokusech, při nichž pracovali s experimentální infekcí *M. gallisepticum*, avšak pro srovnání účinnosti používali ve vodě rozpustný Spectinomycin.

Zvýšené hynutí kuřat ve stáří 49 až 60 dnů bylo vyvoláno snížením úrovně zoohygieny prostředí (zvýšená prašnost, nedostatečné větrání, velké množství drůbeže na malé ploše, vypuknutí kokcidiózy v důsledku nedodržené receptury krmné směsi), což vedlo k tomu, že se mykoplazmóza — komplikovaná silnou infekcí *E. coli* — v tomto období projevila za charakteristických klinických příznaků. Je nesporným kladem ověřovaného preparátu, že právě za těchto zhoršených podmínek prokázal výrazně lepší výsledky než u nás běžně používaný Spectam.

Z hlediska patologicko-anatomického nálezu u uhynulých kuřat jsou opět lepší výsledky u skupiny ošetřené Linco-Spectinem 100; výskyt aerosacculitidy, pericarditidy a perihepatitidy v období v 5. až 9. týdnu se pohyboval kolem 20 %, u skupiny spectamované dosáhl 60 % a u kontrolní skupiny 80 %. Ve

srovnání s výsledky, které uvádí Hamdy (1970) (perikarditida, perihepatitida a aerosacculitida u skupiny s Linco-Spectinem 100 1,2 %, u skupiny se Spectinomycinem 11 % a u kontrolní skupiny 60 %), bylo tedy procento pozitivních PA nálezů značně vyšší; vysvětlujeme to velmi silným pomnožením *E. coli*, jak vyplývá z mikrobiologického vyšetření. Tím se potvrzuje velmi nebezpečné komplikující působení koli-infekcí na průběh mykoplazmózy u kuřat, což je v plné shodě s údaji Stipkowitse a kol. (1970), Verma a Adlakha (1971) a Jurajdy (1971).

K výsledkům sérologického vyšetření je třeba poznamenat, že diferenciální diagnostikou na podkladě pravidelné kontroly zdravotního stavu drůbeže a mikrobiologického a histologického vyšetření byly vyloučeny choroby, které mohly vyvolat nespecifické reakce při aglutinaci na průkaz specifických protilátek proti *M. gallisepticum*, o kterých se zmiňuje Roberts (1970).

V souvislosti s uvedenou problematikou považujeme na závěr za vhodné upozornit na skutečnost, že v současné době probíhá ověřování domácího preparátu s obsahem erytromycinu jako účinné látky; tento preparát je určen k prevenci a léčbě mykoplazmózy drůbeže.

Literatura

BERTOLDINI G. a kol., 1969, Treatment of avian mycoplasmosis. I. Activity *in vitro* and *in vivo* of certain antibiotics against *Mycoplasma gallisepticum*. Archo vet. ital. 20 : 273-283.

GERLACH H., 1968, Problems of the treatment of *Mycoplasma gallisepticum* infection in fowls. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 81 : 448-452.

HAMDY A. H., BLANCHARD C. J., 1969, Chemotherapy of airsacculitis infection in chickens. Bact. Proc.: 86.

HAMDY A. H., 1970, Therapeutic effect of Linco-Spectin on airsacculitis in chicken. Avian Dis. 14 : 706-714.

HLOŽÁNEK I., 1971, Leukóza a ostatní vertikální infekce drůbeže — možnosti detekce a eliminace. Veterinářství 21, 6 : 245-250.

JURAJDA V., 1971, K otázce mykoplasmósy drůbeže a její terapie. Veterinářství 21, 6 : 250-252.

LECLERC J. J., 1971, Sensitivity of avian mycoplasmosis to antibiotics. Recl. Méd. vét. 147 : 169-174.

LUKAS J. H. S., INGLIS J. M., 1970, Treatment of mycoplasmosis in broiler fowl by incorporating spiramycin in the drinking water. Cah. Méd. vét. 39 : 43-52.

MARCA G. a kol., 1970, Treatment of avian mycoplasmosis. II. *In vivo* activity of some antibiotics against a mixed *Mycoplasma gallisepticum* and *Haemophilus gallinarum* infection. Archo vet. ital. 21 : 39-48.

MATZER N., 1969, Furaltadone and tylosin tartrate in the control of experimentally induced chronic respiratory disease complex in chickens. Poult. Sci. 48 : 701-705.

ROBERTS D. H., 1970, Non-specific agglutination reaction with *Mycoplasma gallisepticum* antigens. Vet. Rec. 87 : 125-126.

STIPKOVITS L. a kol., 1970, Determination of the lethality index for day-old chicks, of *E. coli* strains isolated from poultry. Magy Állatorv. Lap. 25 : 102-104.

SÝKORA V., 1971, Ozdravování velkochovů drůbeže od nákaz. Veterinářství 21, 6 : 243-245.

VERMA K. C., ADLAKHA S. C., 1971, *Escherichia coli* and other anterobacteriaceae group of organisms from different pathological conditions in poultry. Indian vet. J. 48 : 107-108.

ZOLLI E., POLEWACZYK D. E., 1970, Use of Spectomycin to control poultry diseases (chronic respiratory disease with *Escherichia coli* infection, the *Salmonella typhimurium* and Arizona group infection and fowl cholera). Vet. Glasn. 24 : 671-678.

Došlo dne 2. 2. 1973

ШКАЛОУД Й., ВЫГНАЛЕК Й., ВЛАСАК Й., ВЛАСАКОВА Й. (Институт госконтроля ветеринарных биопрепаратов и лекарств, Брно; Предприятие по селекции птицы, Добрженице, Чехословакия). **Клиническая проверка эффективности препарата Линко-Спектина 100 для подавления CRD у 217 цыплят.** Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 431-440, 1973.

У 5668 цыплят ЛБ-Юбилянт в лабораторном и клиническом порядке путем систематического доказательства микоплазмозы произвели 72 клинические проверки действия профилактических дозировок Линко-Спектина 100 и сравнили с действием антибиотика Спектам в инъекциях и с необработанной группой. Основой заключительной оценки действия препарата служил ежедневный контроль смертности наряду с патолого-анатомическим диагнозом. В то же время контролировали вес цыплят и производили серологическое, гистологическое и микробиологическое исследования. Испытываемый препарат Линко-Спектин 100 оказался действеннее нашего распространенного Спектама для ин. До 44-дневного возраста меньшая смертность I гр. (Линко-Спектин 100), чем во II гр. (Спектам) статистически недостоверна, В ходе всего опыта разница в смертности I гр. и III гр. (контроль) высокозначима. Патолого-анатомические диагнозы умерших цыплят (характерные цитоплазмом) I группы в период от 5-й до 9-й недели составляли около 20 %, II группы — 60 %, а у контроля — 80 %. Контроль среднего веса не показал никаких существенных различий между группами. Что касается серологического исследования по Галлитесту, контроль дал больше всего положительных реакций, затем следует II группа, а у I группы положительных реакций не обнаружено.

цыплята; микоплазмоз; коли-инфекция; Линкомицин; Спектиномицин; применение в воде

ŠKALOUD J., VYHNÁLEK J., VLASÁK J., VLASÁKOVÁ J. (State Control Institute of Veterinary Biopreparations and Medicaments, Brno, Poultry Breeding Enterprise Dobřenice, Czechoslovakia). *Clinical Checking of the Effectiveness of the Preparation Linco-Spectin 100 for Subduing of CRD in Chicken.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 431-440, 1973.

In 5668 chickens of the breed White Leghorn-Jubilant 72 in a flock with mycoplasmosis proved systematically in laboratory as well as clinically a clinical check of the effectiveness of prophylactic doses of Linco-Spection 100 was made as compared with the effectiveness of the antibiotic Spectam *pro inj.* and with the untreated group. The daily check of death losses together with the evaluation of the patho-anatomic finding served as a base for the final evaluation of the preparation. At the same time the weight of the chickens was checked and a serological, histological and microbiological examination was made. During the experiment the tested preparation Linco-Spectin 100 showed better results than the Spectam *pro inj.* usually used in our country. The lower number of dead chickens in the group I (Linco-Spectin 100) than in the group II (Spectam) was not statistically significant throughout the period up to the 44th day of age. Beginning with the 44th day of age this difference was already statistically very significant. The difference in death losses between group I and group III (control) was statistically very significant throughout the whole experiment. Patho-anatomic findings characteristic of mycoplasmosis in dead chickens amounted to round 20 % during the period from the 5th to 9th week in the group treated with Linco-Spectin 100 and reached 60 % in the spectamated group and 80 % in the control group. The weight check showed no considerable differences between the groups. A serological examination with Galli-test showed the greatest number of positive reactions in the control group, then in the spectamated group, whereas no positive reaction occurred in the group treated with Linco-Spectin 100.

chickens; mycoplasmosis; coli infection; Lincomycin; Spectinomycin; application in water

ŠKALOUD J., VYHNÁLEK J., VLASÁK J., VLASÁKOVÁ J. (Institut für Staatskontrolle der Biopräparate und Medikamente, Brno, Unternehmen für Geflügelzucht, Dobřenice, Tschechoslowakei). *Klinische Nachprüfung der Wirksamkeit des Präparates Linco-Spectin 100 zur Dämpfung von CDR bei Küken.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 431-440, 1973.

In einer Zucht mit systematisch labormäßig sowie klinisch nachgewiesenen Mykoplasmose wurde bei 5668 Hühnern der Rasse WL-Jubilant 72 eine klinische Wirksam-

keitsprüfung der prophylaktischen Gaben von Linco-Spectin 100 durchgeführt im Vergleich zu der Wirksamkeit des Antibiotikums Spectam *pro inj.* und zu der unbehandelten Gruppe. Die tägliche Kontrolle der Verenden zusammen mit der Bewertung des pathoanatomischen Befundes diente als Unterlage für die endgültige Wirksamkeitsbeurteilung des Präparats. Gleichzeitig wurde das Gewicht der Hühner kontrolliert und die serologische, histologische und mikrobiologische Untersuchung durchgeführt. Im Laufe des Versuches erwies das geprüfte Präparat Linco-Spectin 100 bessere Ergebnisse als das bei uns gewöhnlich benützte Spectam *pro inj.* Im Zeitabschnitt bis zum 44. Alterstage war die niedrigere Anzahl der verendeten Hühner bei der Gruppe I (Linco-Spectin 100) als bei der Gruppe II (Spectam) nicht statistisch signifikant. Von dem 44. Alterstage war dieser Unterschied bereits statistisch hoch signifikant. Im Laufe des ganzen Versuches war der Unterschied in den Verenden zwischen der Gruppe I und Gruppe III (Kontrolle) statistisch hoch signifikant. Die die Mykoplasmose charakterisierenden pathoanatomischen Befunde bei den verendeten Hühnern bewegten sich in der Zeitspanne der 5. bis 9. Woche bei der mit Linco-Spectin 100 behandelten Gruppe rund 20 %, bei der spectamierten Gruppe erreichten sie 60 % und bei der Kontrollgruppe 80 %. Durch die Durchschnittsgewichtskontrolle wurden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt. Die mit Galli-Test durchgeführte serologische Untersuchung erwies die meisten positiven Reaktionen bei der mit Linco-Spectin 100 behandelten Gruppe keine positive Reaktion erfolgte.

Hühner; Mykoplasmose; Coli infektion; Lyncomycin; Specetinomycin; Applikation im Wasser

Adresa autorů:

MVDr. J. Škaloud, MVDr. J. Vyhnálek, Ústav pro státní kontrolu veter. biopreparátů a léčiv, 600 00 Brno-Medlánky

VÝSKYT DIFERENCOVANÝCH AMINOPEPTIDÁZ V KRVNÝCH SÉRACH

V. Lenártová, A. Šamo, M. Teleha, K. Holovská, M. Bartík

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

LENÁRTOVÁ V., ŠAMO A., TELEHA M., HOLOVSKÁ K., BARTÍK M. *Výskyt diferencovaných aminopeptidáz v krvných sérach.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : : 441-448, 1973.

Bolo prevedené porovnávacie štúdium arylamidáz v hovädzom sére a v sére netehotných a tehotných žien. Gélovou filtráciou na Sephadexe G-200 sa v sérach zistili dve odlišné enzymatické frakcie s aktivitou k p-nitroanilidom l-leucínu, l-lyzínu a l-fenylalanínu. Elektroforéza na polyakrylamidovom géli ukázala v ženských sérach tri enzymatické frakcie s aktivitou k týmto substrátom. V sére tehotných žien bola navyše identifikovaná jedna enzymatická frakcia odpovedajúca sérovej oxytocináze. Značné diferencie oproti ženským séram sa prejavili v hovädzom sére. Boli tu nájdené dve enzymatické frakcie s aktivitou k p-nitroanilidom l-leucínu a l-fenylalanínu, líšiace sa svojou elektroforetickou pohyblivosťou od frakcií v ženských sérach. Z hovädzieho séra bola čiastočne purifikovaná leucylarylaminopeptidáza s pH optimom 7,4 až 7,6, ktorá bola aktivovaná katiónmi zinku, horčíka, mangánu a kobaltu. Aktivačné účinky mali cysteín a glutatión.

aminopeptidázy; arylamidázy; enzymatická diagnostika

Variabilita arylamidáz v sérach rôznych živočíšnych druhov bola pozorovaná viacerými autormi (Nagatsu a kol. 1968, Beckman a kol. 1966, Beier a kol. 1969, Bartík, Michnová 1971). Pri elektroforetickom rozdelení séra ošípanej, ovce, kravy a koňa na agarovom géli sa objavili dve enzymatické frakcie s aktivitou oproti p-nitroanilidu l-leucínu, pričom kvantitatívne zastúpenie týchto frakcií u jednotlivých druhov hospodárskych zvierat bolo odlišné (Šamo, Bartík 1972). Podobný obraz poskytuje aj sérum netehotných žien, u ktorého boli po elektroforetickom rozdelení na škrobovom géli identifikované dve enzymatické zóny. V sére tehotných žien sa nachádzala ďalšia enzymatická zložka, ktorá — ako sa ukázalo neskoršie — odpovedala sérovej oxytocináze (Wintersberger, Tuppy 1960, Page a kol. 1961, Glendenningová a kol. 1965).

Rozvoj čistiacich metodík umožnil purifikáciu niektorých sérových aminopeptidáz a tým aj pomohol čiastočne ohraničiť ich fyziologickú funkciu. Postupne boli purifikované: oxytocináza, ktorá zasahuje do metabolizmu neurohormónov a iných biologicky aktívnych peptidov (Čihař a kol. 1961, Barth 1966, Sjöholm, Yman 1966), aminopeptidáza A, ktorá má

vzťah k metabolizmu angiotenzínu (Yman, Kulling 1969a, b) a bola popísaná lyzínaminopeptidáza, ktorá pravdepodobne ovplyvňuje metabolizmus kinínov (Berrens 1968). Široká variabilita arylamidáz, ako aj ich vzťah k biologicky aktívnym peptidom, dávajú tušiť výskyt aj iných špecifických aminopeptidáz v sére.

Cieľom tejto práce bolo porovnať distribúciu arylamidáz v hovädzom sére a v sére netehotných a tehotných žien a pokúsiť sa o čiastočnú charakterizáciu týchto enzýmov.

MATERIÁL A METÓDY

Distribúcia enzymatickej aktivity oproti aminokyselinovým derivátom p-nitroanilínu bola sledovaná v sérach zdravých netehotných žien a v sérach zdravých žien v X. lunárnom mesiaci gravidity, získaných punkciou lakťovej žily. Kravské sérum bolo odobrané z krčnej žily zdravých kráv. Enzymatická aktivita sér bola sledovaná oproti p-nitroanilidom l-leucínu, l-lyzínu a l-fenylalanínu, ktoré boli syntetizované ing. Kasafírkom z Ústavu pre farmáciu a biochémiu v Prahe. Pri purifikačných postupoch bol použitý Sephadex G-200 fy Pharmacia Uppsala-Sweden a DEAE celulóza MN-300 fy Manchery Nagel and Co. Všetky ostatné použité chemikálie boli čistoty *p. a.*

Frakcionácia sérových bielkovín bola prevedená na stĺpci Sephadexu G-200. Vzorky séra boli aplikované na stĺpec o rozmeroch 4,5 × 85 cm. Elúcia sa prevádzala 0,2 M Tris-HCl pufrom pH 7,8 s 0,5 M NaCl pri + 5 °C. Rýchlosť prietoku bola 15 ml/hod., frakcie boli zbierané v 10minútových intervaloch.

Na ďalšiu frakcionáciu bol použitý stĺpec DEAE celulózy o rozmeroch 2,7 × 35 cm. Po nanesení vzorky bol stĺpec premývaný 100 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 8,0 s 0,05 M NaCl a potom fosfátovým pufrom s klesajúcim gradientom pH a vzrastajúcim lineárnym koncentračným gradientom NaCl. Gradient:

250 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 8,0 s 0,05 M NaCl;

250 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 6,0 s 0,5 M NaCl.

Elučná rýchlosť bola 30 ml/hod. Frakcie boli zbierané v 10minútových intervaloch. Bielkovinové frakcie boli vyhodnotené meraním extinkcie pri vlnovej dĺžke 280 nm.

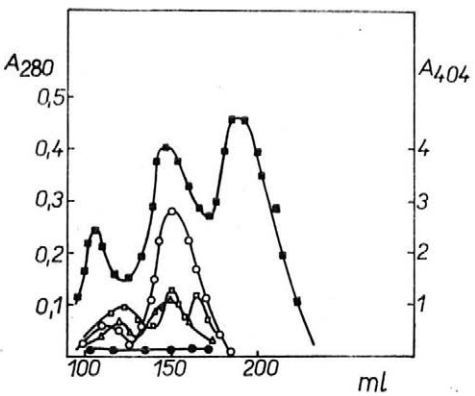
Elektroforetické delenie enzýmov bolo prevádzané metódou Ornsteina a Dawisa (1962) v 7% polyacrylamidovom géli (Lachema) v Tris-glycínovom pufri pH 8,3 (6 g Trisu a 28,8 g glycínu v 1 l vody) pri 5 mA na trubičku po dobu 75 min. Detekcia bielkovín bola prevedená vyfarbením pomocou 1% amidočerne 10 B v 7% kyseline octovej. Pre zistenie lokalizácie enzymatickej aktivity bola zvolená metóda Mäkkinena a Raekalia (1969). Stĺpec gélu bol podelený na 1,5 mm hrubé, priečne rezy, ktoré boli jednotlivo prenesené do skúmaviek. Elúcia enzýmu prebiehala počas 24 hodín do 0,1 M fosfátového pufru pH 7,5. Inkubácia enzýmov s 5.10^{-4} M roztokmi aminokyselinových derivátov p-nitroanilínu v 0,1 M fosfátovom pufri trvala 5 hodín pri 30 °C. Množstvo odštiepeného p-nitroanilínu bolo merané pri 404 nm.

Aktivita enzýmov bola stanovená pomocou aminokyselinových derivátov p-nitroanilínu. Metodika navrhnutá Tuppym a kol. (1962) bola upravená

nasledovne: K 0,1 ml enzymatickej frakcie bolo pridané 0,05 ml substrátu (10^{-2} M roztok p-nitroanilidu v 10^{-2} M HCl) a objem doplnený na 0,45 ml 0,1 M fosfátovým pufrom pH 7,5. Po 2hodinovej inkubácii pri 30 °C bola reakcia zastavená pridaním 0,3 ml 0,25 M HCl. Obdobne bol prevedený kontrolný pokus, u ktorého enzymatická reakcia bola okamžite zastavená pridaním HCl. Enzymatická aktivita se zistila pomocou množstva odštiepeného p-nitroanilínu, ktorý sa stanovil spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 404 nm.

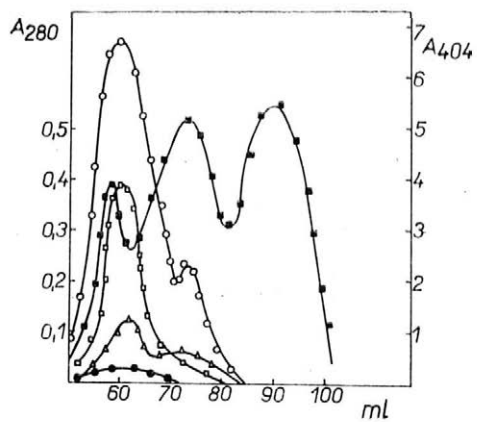
Pre určenie závislosti enzymatickej aktivity na pH boli použité fosfátové pufre v rozmedzí pH 5,8 až 8,0 a Tris-HCl pufre v rozmedzí pH 8,2 až 8,4. K 0,1 ml dialyzovaného enzýmu (12 hodín oproti destilovanej vode) bolo pridané 0,7 ml pufru a 0,2 ml substrátu (10^{-2} M p-nitroanilid l-leucínu). Zmes bola inkubovaná pri 30 °C a po dvoch hodinách bola reakcia zastavená pridaním 0,2 ml 0,25 M HCl.

Inhibičný a aktivačný efekt katiónov kovov na enzymatickú aktivitu bol sledovaný v rozmedzí 10^{-1} až 10^{-3} M koncentrácie týchto látok v reakčnej zmesi. Vplyv organických látok na enzymatickú aktivitu bol sledovaný v rozmedzí koncentrácie 10^{-1} až 10^{-3} M. Frakcionácia sérových bielkovín síranom amonným sa prevádzala pri 5 °C. Nasýtený roztok síranu amonného (pH bolo upravené hydroxidom amonným na 8) sa pridával k séru za stáleho miešania v takom množstve, aby jeho výsledná koncentrácia v roztoku bola 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 %. Vzorky boli centrifugované 20 min. pri 600 g. Sedimenty a supernatanty boli po odstránení solí dialýzou oproti destilovanej vode vysušené mrazovou sublimáciou.



1. Gélová filtrácia bielkovín séra netehotných žien na stĺpci Sephadexu G-200 (rozmer stĺpca 4,5 × 85 cm); elúcia: 0,5 M NaCl v 0,2 M Tris-HCl pufri pH 7,8 prietok: 15 ml/hod

■—■ koncentrácia bielkovín
○—○ enzymatická aktivita oproti p-NA-l-leucínu
□—□ enzymatická aktivita oproti p-NA-l-lyzínu
△—△ enzymatická aktivita oproti p-NA-l-fenylalanínu
●—● enzymatická aktivita oproti p-NA-l-prolínu

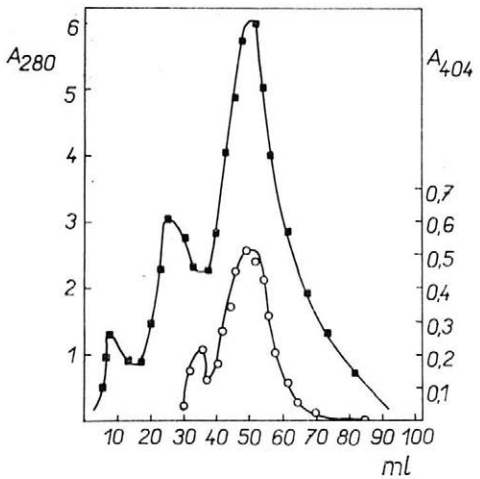


2. Gélová filtrácia bielkovín séra tehotných žien na stĺpci Sephadexu G-200 (rozmer stĺpca 4,5 × 85 cm); elúcia: 0,5 M NaCl v 0,2 M Tris-HCl pufri pH 7,8; prietok: 15 ml/hod

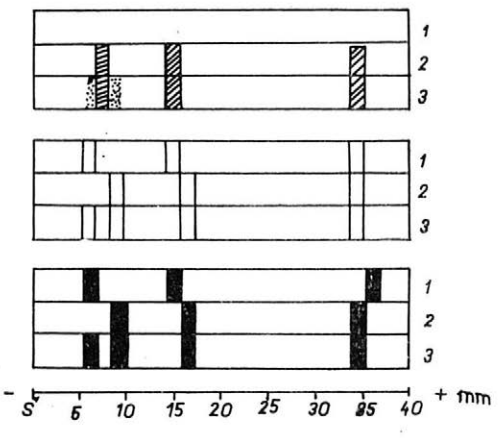
■—■ koncentrácia bielkovín
○—○ enzymatická aktivita oproti p-NA-l-leucínu
□—□ enzymatická aktivita oproti p-NA-l-lyzínu
△—△ enzymatická aktivita oproti p-NA-l-fenylalanínu
●—● enzymatická aktivita oproti p-NA-l-prolínu

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Gélovou filtráciou sa enzymatická aktivita v ženskom sére rozdelila na dve frakcie hydrolyzujúce p-nitroanilid l-leucínu a l-lyzínu (obr. 1). Aj za fyziologickej gravidity boli v sére zistené dve frakcie hydrolyzujúce tieto substráty, avšak enzymatická aktivita v oblasti makroglobulínov bola podstatne zvýšená (obr. 2). Podobné výsledky obdržali Goebelsman a Beller (1965), ktorí však v sére netehotných žien identifikovali len jednu enzymatickú frakciu. Maximálna enzymatická aktivita v hovädzom sére bola viazaná na bielkoviny s menšou molekulovou váhou (obr. 3). V homogenátoch niektorých hovädzích orgánov boli pozorované dve enzymatické frakcie, pričom v supernatantoch mozgu, svalu, pankreasu, srdca a pečene boli maximálne aktivity tiež viazané na bielkoviny s menšou molekulovou váhou (Blahovec 1970).

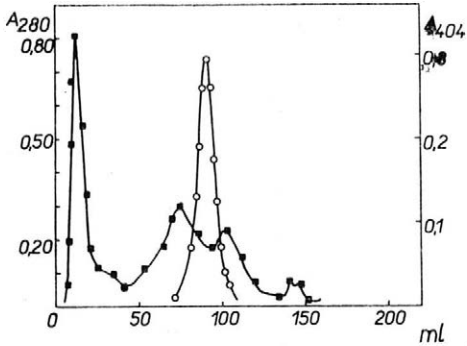


3. Gélová filtrácia bielkovín kravského séra na stĺpci Sephadexu G-200 (rozmer stĺpca 4,5 × 85 cm); elúcia: 0,5 M NaCl v 0,2 M Tris-HCl pufri pH 7,8; prietok: 15 ml/hod
■—■ koncentrácia bielkovín
○—○ enzymatická aktivita oproti p-NA-l-leucínu

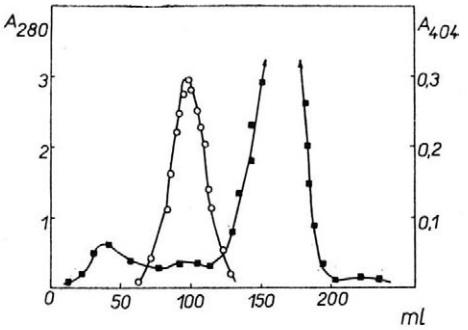


4. Distribúcia enzymatickej aktivity v kravskom sére (1), v sére netehotných žien (2) a v sére tehotných žien (3) po elektroforéze na polyacrylamidovom géli
■ enzymatická aktivita oproti p-nitroanilidu l-leucínu
/// enzymatická aktivita oproti p-nitroanilidu l-lyzínu
□ enzymatická aktivita oproti p-nitroanilidu l-fenylalanínu

Značné rozdiely v distribúcii aminopeptidázovej aktivity v ženských sérach a v sére kráv ukázala elektroforéza na polyacrylamidovom géli (obr. 4). V sére tehotných žien bola naviac identifikovaná jedna enzymatická zložka odpovedajúca sérovej oxytocináze, ktorá sa nenachádzala v sére netehotných žien a v sére kráv. Niektorí autori (Tuppy a kol. 1963, Glendenningová a kol. 1965) pozorovali, že oxytocináza sa elektroforeticky delí na dve konformačné zložky, avšak v rozmedzí pH 8,2 až 9,6, teda aj za našich experimentálnych podmienok sú obidve zložky v rovnováhe (Yman, Sjöholm 1967). Zaujímavým poznatkom pri elektroforetickom sledovaní hovädzieho séra je výskyt dvoch enzymatických frakcií s aktivitou k p-nitroanilidu l-fenylalanínu, ktoré sa líšia svojou elektroforetickou pohyblivosťou od frakcií v ženských sérach. Enzým s touto aktivitou sa podarilo čiastočne purifikovať (Teleha



5. Gélová filtrácia enzymatickej frakcie hovädzieho séra, získanej po vyzrážaní síranom amonným na stĺpci Sephadexu G-200; elúcia: 0,1 m fosfátový pufer pH: 7,5; prietok: 15 ml/hod
■—■ koncentrácia bielkovín
○—○ enzymatická aktivita oproti p-nitroanilidu l-leucínu



6. Chromatogram frakcie hovädzieho séra, získanej po zrážaní síranom amonným a gélovej filtrácii na stĺpci DEAE celulózy
(Podmienky delenia v metodickej časti)

1971). Z pozorovaných enzymatických frakcií v sére žien a v kravskom sére len oxytocináza javila aktivitu oproti oxytocínu a vasopresínu a jeho analógom (Lenártová 1971). Získané výsledky ukazujú, že druhové rozdiely sa prejavujú nielen v aktivite k jednotlivým chromogénnym substrátom, ale aj v rôznej elektroforetickej mobilite enzymatických frakcií.

Rozdiely v distribúcii enzymatickej aktivity v študovaných sérach boli pozorované aj pri frakcionácii síranom amonným. Zatiaľ čo v ženských sérach bolo maximum enzymatickej aktivity nájdené v sedimentoch, v kravskom sére bola nájdená najvyššia aktivita v supernatantoch pri 50 až 55% nasýtení síra-

I. Vplyv niektorých katiónov kovov a SH látok na enzymatickú aktivitu hovädzej leucylarylaminopeptidázy

Efektor	Koncentrácie (M)	% inhibície (aktivácie +)	Efektor	Koncentrácia (M)	% inhibície (aktivácie +)
Cu^{2+}	10^{-2} 10^{-3}	70,3 0,0	Mn^{2+}	10^{-2} 10^{-3}	3,6 +32,0
Hg^{2+}	10^{-2} 10^{-3}	85,1 79,2	Mg^{2+}	10^{-2} 10^{-3}	+17,0 +16,1
Ca^{2+}	10^{-2} 10^{-3}	34,1 0,0	Co^{2+}	10^{-2} 10^{-3}	3,6 +32,0
Ni^{2+}	10^{-2} 10^{-3}	28,5 25,4	CySH	10^{-2} mM 10^{-3} mM	+16,1 +16,1
Zn^{2+}	10^{-3} 10^{-4}	+8,9 +14,0	GluSH*)	10^{-2} mM 10^{-3} mM	+16,1 +16,1

*) glutatión

nom amonným. Táto enzymatická frakcia štiepiaca p-nitroanilid l-leucínu bola z kravského séra čiastočne purifikovaná gélovou filtráciou na Sephadexe G-200 (obr. 5) a chromatografiou na DEAE celulóze (obr. 6). Bolo zistené, že jej pH optimum leží v rozmedzí 7,4 až 7,6 a je inhibovaná katiónmi medi, ortuti, vápnika a niklu. Aktivačný účinok bol pozorovaný u katiónov zinku, mangánu, horčíka a kobaltu. Aktivačne pôsobia aj cysteín a glutatión (tab. I). Aktivačné účinky katiónov zinku, kobaltu a mangánu sú pozoruhodné, pretože sérovú oxytocinázu inhibujú (Barth a kol. 1967). Naproti tomu katión vápnika, ktorý aktivuje ľudskú sérovú aminopeptidázu A (Yman, Kulling 1969a, b), má inhibičné účinky.

Fyziologická úloha aminopeptidáz v sére nie je zatiaľ dostatočne objasnená. Okrem oxytocinázy, ktorá ovplyvňuje katabolizmus neurohormónov (Sjöholm, Yman 1967) a aminopeptidázy A, ktorá má vzťah k metabolizmu presorických látok (Yman, Kulling 1969a, b, Nagatsu a kol. 1970) je ich úloha zatiaľ nejasná.

Literatúra

BARTH T., 1966, Inaktivace oxytocinu sérovou oxytocinasou a jinými enzýmy. Kandidátská disertační práce Praha.

BARTH T., PLIŠKA V., RYCHLÍK I., ŠORM F., 1967, Enzymic inactivation of oxytocin. V. Purification and some properties of enzymes from human retroplacental serum. Colln. Czech. Chem. Commum. 32 : 2327-2336.

BARTÍK M., MICHNOVÁ E., 1971, Arylamidázová aktivita v krvných sérach domácich zvierat. Vet. Med. (Praha) 11 : 645-653.

BECKMAN L., BJÖRLING G., CHRISTODOULOU C., 1966, Pregnancy enzymes and placental polymorphism II. Leucine aminopeptidase. Acta Genet. Basel 16 : 122-131.

BEIER L., BEIER I., HASCHEN R. J., 1969, Isoenzyme der Alaninaminopeptidase als specifische Parameter in der Diagnostik von Erkrankungen der Gallenwege und des Pankreas. Clinica Chim. Acta 24 : 405-410.

BERRENS L., 1968, Inhibition of LAP and lys-aminopeptidase by atopic allergens. Nature 217 : 664.

BLAHOVEC J., 1970, Arylamidázy v orgánoch a telesných tekutinách domácich zvierat. Kandidátska dizertačná práca, VŠV Košice.

ČIHAŘ M., BERÁNKOVÁ Z., RYCHLÍK I., ŠORM F., 1961, Enzymic inactivation of oxytocin IV. Characterization of purified preparations of serum oxytocinase. Colln. Chem. Commun. 26 : 2632-2641.

GLENDENNING M. B., TITUS M. A., SCHROEDER S. A., MOHUN G., PAGE E., 1965, The destruction of oxytocin and vasopressin by the aminopeptidases in sera from pregnant women. J. Obstet. Gynec. 92 : 814-820.

GOEBELSMANN V., BELLER F. K., 1965, Separation of cystineaminopeptidase and their determination in pregnant and nonpregnant women. Z. klin. Chem. 3 : 49-54.

LENÁRTOVÁ V., 1971, O niektorých problémoch metabolizmu neurohormónov. Kandidátska disertačná práca, VŠV Košice.

MÄKINNEN P. L., RAEKALIO G., 1969, Characterization of four arylaminopeptidases of rat skin. Enzymologia. 36 : 93-110.

NAGATSU I., NAGATSU T., GLENNER G. G., 1968, Species differences of serum amino acid β-naftylamidases. Enzymologia 34 : 73-76.

NAGATSU I., NAGATSU T., YAMAMOTO T., GLENNER G. G., MEHL J. W., 1970, Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme. Biochem. biophys. Acta 198 : 255-270.

ORNSTEIN L., DAWIS B. J., 1962, Disc Electrophoresis (preprint publication Distillation Products Industries Eastman Kodak Co).

PAGE E. W., TITUS M. A., MOHUN G., GLENDENNING M. B., 1961, The origin and distribution of oxytocinase. Am. J. Obstet. Gynec. 82 : 1090-1095.

SJÖHOLM I., YMAN L., 1966, Preparation of highly purified oxytocinase (cystine aminopeptidase) from retroplacental serum. Acta Pharm. Suec. 3 : 377-388.

SJÖHOLM I., YMAN L., 1967, Degradation of oxytocin, lysine-vasopressin, angiotensin II and angiotensin II — amid by oxytocinase (cystine aminopeptidase). Acta Pharm. Suec. 4 : 65-76.
ŠAMO A., BARTÍK M., 1972, Heterogenita arylamidáz štiepiacich l-leucyl-p-nitroanilid v krvných sérach hospodárskych zvierat. Vet. Med. (Praha) 17 : 243-248.
TELEHA M., 1971, Výskyt, izolácia a čiastková charakterizácia niektorých aminopeptidáz krvného séra. Habilitačná práca, VŠV Košice.
TUPPY H., WIESBAUER W., WINTERSBERGER E., 1962, Aminosäure p-nitroanilide als Substrate für Aminopeptidasen und andere proteolitische Fermente. Hoppe-Seyler's Zeitschr. für Physiol. Chem. 329 : 278-288.
TUPPY H., WIESBAUER W., WINTERSBERGER E., 1963, Über die Einwirkung von Neuraminidase auf die Serum Oxytocinase. Monatsch. Chem. 94 : 321-328.
WINTERSBERGER E., TUPPY H., 1960, Zonen-Elektrophorese von Aminopeptidasen in Stärkegel. Monatsch. Chem. 91 : 406-411.
YMAN L., SJÖHOLM I., 1967, Some physico-chemical properties of oxytocinase (cystine aminopeptidase). Acta Pharm. Suec. 4 : 13-22.
YMAN L., KULLING B., 1969a, An aminopeptidase from human serum specific for hydrolysis of α-l-dicarboxylic acid residues. I. Acta Pharm. Suec. 6 : 561-568.
YMAN L., KULLING B., 1969b, An aminopeptidase from human serum specific for hydrolysis of α-l-dicarboxylic acid residues II. Acta Pharmac. Suec. 6 : 569-577.

Došlo dne 26. 9. 1972

ЛЕНАРТОВА В., ШАМО А., ТЕЛЕГА М., ГОЛОВСКА К., БАРТИК М. (Вышшая школа ветеринарской медицины, Кошице, Чехословакия). **Наличие дифференцированных аминопептидаз в сыворотках крови.** Vet. Med. (Praha) 18 (2) : 441-448, 1973.

Ариламидазу в говяжьей сыворотке сравнивали с сывороткой беременных и небеременных женщин. С помощью гелевой фильтрации на Сефадексе Г-200 в сыворотках установлены две разные энзиматические фракции, активные к п-нитроанилидому л-лейцина, л-лизина и л-фенилаланина. Электрофорез на полиакриламидном геле показал в женских сыворотках 3 энзиматические фракции с активностью к этим субстратам. В сыворотках беременных женщин обнаружили в добавок еще одну энз. фракцию, отвечающую сывороточной окситоценазе. Женская сыворотка значительно отличается от говяжьей, в которой найдены 2 энз. фракции с активностью к п-нитроанилидому л-лейцина и л-фенилаланина, электрофоретическая подвижность которых отличает их от фракций в женских сыворотках. Из говяжьей сыворотки частично пурифицировали лейцилариламинопептидазу с pH оптимумом 7,4—7,6, которая активируется катионами цинка, магния, мангана и кобальта. Активирующим действием обладают также цистеин и глутатион.

аминопептидазы; ариламидазы; энзиматическая диагностика

LENÁRTOVÁ V., ŠAMO A., TELEHA M., HOLOVSKÁ K., BARTÍK M. (University School of Veterinary Medicine, Košice, Czechoslovakia). *The Occurrence of Differentiated Aminopeptidases in Blood Serums.* Vet. Med. (Praha) 18 (2) : 441-448. 1973.

Arylamidases were subject to comparative study in the cattle serum and in the serums of non-pregnant and pregnant women. Gel filtration on Sephadex G-200 revealed two different enzymatic fractions with activity to l-leucine, l-lysine and l-phenylalanine p-nitroanilides. Electrophoresis on polyacrylamide gel revealed three enzymatic fractions with activity to these substrates in the women's serums. In addition, one enzymatic fraction corresponding to oxytocinase was identified in the serum of pregnant women. The cattle serum showed large differences from the women's serums. Two enzymatic fractions with activity to l-leucine and l-phenylalanine p-nitroanilides were found in the cattle serum; these fractions had electrophoretic mobility considerably different from the fractions in women's serums. Leucylarylaminopeptidase with pH optimum 7.4—7.6 activated with zinc, magnesium, manganese and cobalt cations was partially purified from the cattle serum. Cysteine and glutation had activation effects.

aminopeptidases; arylamidases; enzymatic diagnosis

LENÁRTOVÁ V., ŠAMO A., TELEHA M., HOLOVSKÁ K., BARTÍK M. (Hochschule für Veterinärmedizin, Košice, Tschechoslowakei). *Vorkommen von differenzierten Aminopeptidasen in Blutseren.* Vet. Med. (Praha) 18 (2) : 441-448, 1973.

Es wurde das Vergleichsstudium von Arylamidasen im Rinderserum und im Serum der schwangeren und nicht schwangeren Frauen vorgenommen. Durch eine Gelfiltration auf Sephadex G-200 wurden in den Seren zwei unterschiedliche enzymatische Fraktionen mit Aktivität gegenüber p-Nitroanilidom, l-Leuzin, l-Lysin und l-Phenylalanin festgestellt. Die Elektrophorese auf Polyacrylamidgel zeigte in den weiblichen Seren drei enzymatische Fraktionen mit Aktivität gegenüber diesen Substraten. In den Seren von schwangeren Frauen wurde darüber hinaus eine der Serumoxytozinase entsprechende enzymatische Fraktion identifiziert. Beträchtliche Differenzen gegenüber den weiblichen Seren kamen im Rinderserum zum Ausdruck. Es wurden da zwei enzymatische Fraktionen mit Aktivität gegenüber p-Nitroanilidom, l-Leuzin und l-Phenylalanin gefunden, die sich durch ihre elektrophoretische Beweglichkeit von den in weiblichen Seren vorkommenden Fraktionen unterschieden. Aus dem Rinderserum wurde teilweise die Leuzylarylaminopeptidase mit pH-Optimum 7,4—7,6 purifiziert, aktiviert durch Zink-, Magnesium-, Mangan- und Kobaltkationen. Aktivierend wirkten sich Zystein und Glutation aus.

Aminopeptidasen; Arylamidasen; enzymatische Diagnostik

Adresa autorov:

Ing. V. Lenártová, A. Šamo, prom. chem., MUDr. M. Teleha, CSc., ing. K. Holovská, prof. MVDr. M. Bartík, DrSc., Vysoká škola veterinárska, Ústav chémie, biochémie a toxikológie, 041 81 Košice, Komenského 71

OVĚŘENÍ KORNEÁLNÍHO TESTU NA LABORATORNÍCH ZVÍŘATECH K INTRAVITÁLNÍ DIAGNOSTICE VZTEKLINY U ZVÍŘAT

B. Horyna, V. Kabelík

Ústřední státní veterinární ústav, Praha

HORYNA B., KABELÍK V. *Ověření korneálního testu na laboratorních zvířatech k intravitální diagnostice vztekliny u zvířat.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 449-454, 1973.

Byla ověřena možnost intravitální diagnostiky vztekliny korneálním testem u laboratorních zvířat infikovaných intracerebrální a intramuskulární aplikací.. K infekci bylo použito kmene, který byl získán při běžné diagnostice z lišky. Bylo prokázáno, že korneální test je pozitivní u každého zvířete, které klinicky onemocnělo a pozitiva přetrvala i po exitu. V cytoplazmě pozitivních buněk v počátečních fázích onemocnění se vyskytuje drobná žlutozelená fluorescence, která se po rozvinutí klinických symptomů zvětšuje. Mimo buňku uložený antigen vykazuje převážně tečkovitou fluorescenci. U 62 % intramuskulárně infikovaných myší byl prokázán virus vztekliny dříve, než se objevily první klinické příznaky.

vzteklina; imunofluorescence; korneální test

Diagnostika vztekliny se stanoví na základě imunofluorescenčního vyšetření sekčního materiálu z podezřelých zvířat a podle výsledku biologického pokusu. Intravitálně se diagnostikuje vzteklina v indikovaných případech na základě klinického vyšetření spojeného s pozorováním izolovaných zvířat. V současné době neexistuje metoda, která by spolehlivě umožňovala intravitální diagnostiku.

Levaditi a Schoen (1935) klasickým barvením prokázali malá Negriho tělíska v epiteliálních rohovkových buňkách experimentálně infikovaných laboratorních zvířat. Vzhledem k citlivosti barvení měli mimo pozitivních nálezů několik negativních. Použitím rychlé a vysoce specifické imunofluorescenční metody se podstatně zlepšila detekce viru vztekliny; lze jej prokázat i mimo mozkovou tkáň, jak uvádějí Schaaf a Schaal (1968), kteří detekovali virus vztekliny v nadledvinkách, štítné žláze, epifýze, slinných žlázách a retině. Na základě výsledků své práce doporučují jako vzorky tkání k průkazu rabické infekce retiny, krční, hrudní, břišní ganglia a nadledvinky. Schneider (1969) uvádí možnost detekce viru vztekliny z otisků rohovky. Podle tohoto autora je infikování rohovky virem vztekliny dobrým indikátorem začátku periferního šíření viru a infekčnosti vylučovaných slin.

Vzhledem k lehké dostupnosti rohovky a jednoduchosti provedení testu byla ověřena možnost intravitální diagnostiky pomocí otiskových preparátů.

MATERIÁL A METODY

Pro experimentální infekci myší a králíků byl užit rabický kmen L 413, který byl izolován při terénní diagnostice z lišky. Byl použit ve své 10. pasáži na myši (titr. *i. c.* 10^3 MLD 50). Infekce myší byla provedena vždy dávkou 0,03 ml 10% suspenzí myších mozků v pufrovém fyziologickém roztoku (pH 7,2) s 2% koňským sérem. U skupiny 20 myší byla provedena aplikace intracerebrální, u druhé skupiny 50 myší intramuskulární aplikace do plantární stehenní svaloviny. U skupiny 12 králíků bylo použito dávky 3 ml intramuskulárně do bederní svaloviny. K experimentální infekci byla použita zvířata komerční provenience a chována za běžných podmínek.

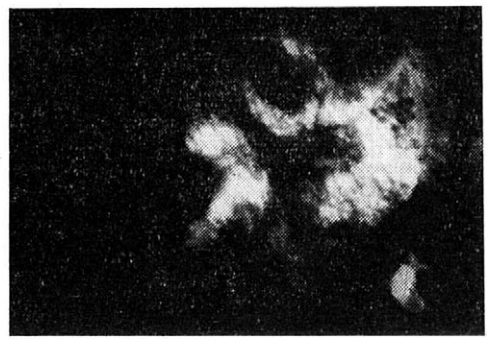
Otiskové preparáty rohovky byly připravovány trojnásobným přitlačením podložního sklíčka na bulbus obou očí. Další postup byl shodný s běžnou rutinní detekcí viru vztekliny. Otiskové preparáty mozkové tkáně uhynulých a utracených zvířat byly pro potvrzení diagnózy vyšetřovány přímým fluorescenčním testem podle D e a n a (1966). Rohovka zvířat před jejich zastavením do pokusu byla vyšetřena imunofluorescencí.

Dále bylo vyšetřeno 454 uhynulých nebo utracených zvířat různých druhů, která byla zaslána do diagnostické laboratoře.

VÝSLEDKY

Pozitivita korneálního testu (KT) přetrvávala nejen po celou dobu onemocnění, ale i po úhynu zvířete. Cytoplazma pozitivních buněk v inkubačním stadiu a v počátečních fázích onemocnění vykazuje žlutozelenou fluorescenci ve formě drobných granulí (obr. 1). Za rozvinutých klinických příznaků dochází ke zvětšování shluků, ke zvýšení intenzity fluorescence (obr. 2). Pozitivní fluorescence je nejdříve pozorována v blízkosti jádra, později se rozšiřuje k periferii buňky. V průběhu celého onemocnění se nacházely buňky s rozdílným počtem fluoreskujících shluků. Počet fluoreskujících pozitivních buněk v zorném poli je malý a jsou velmi lehce odlišitelné od negativních. Antigén není pouze vázán na buň-

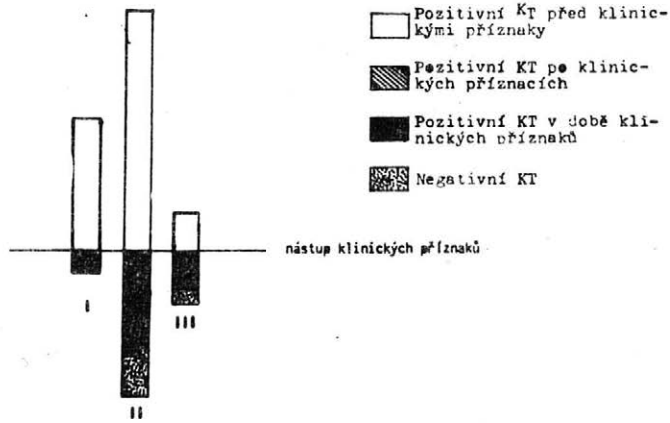
1. Infikované korneální buňky virem vztekliny; přímá imunofluorescence (ML-2; Zorkij-4)
Zvětšeno 400×



2. Shluk infikovaných korneálních buněk — otiskový preparát ze sekčního materiálu (ML-2; Zorkij-4)
Zvětšeno 270×

ky. Velmi často se detekuje jako drobná, tečkovitá fluorescence, která je v zorném poli volně mimo buňku. Dále byla pozorována difúzní fluorescence celé cytoplazmy. Intenzita fluorescence je všeobecně nižší než při detekci v mozkové tkáni. Výsledky pokusu jsou znázorněny na obr. 3.

U 20 intracerebrálně infikovaných myší (skupina I) byl KT za osm dní po infekci pozitivní u všech jedinců. Pozitivní KT byl zjištěn jeden až tři dny před klinickými příznaky onemocnění u 17 myšek. U dvou myšek byl KT pozitivní současně s klinickým onemocněním, u jedné myšky pak dva dny po prvních klinických příznacích onemocnění.



3. Časový nástup detekce viru vztekliny korneálním testem (KT) u experimentálně infikovaných zvířat

Z 50 intramuskulárně infikovaných myší (skupina II) byl KT pozitivní za 9 až 13 dnů po infekci u 44 jedinců. Z těch byl opět KT pozitivní u 31 myši dříve o jeden až tři dny než klinické příznaky. KT souhlasně pozitivní s klinickými příznaky byl zjištěn u 11 myšek. Pouze u dvou myšek byl KT pozitivní jeden a dva dny po objevení se klinických příznaků. U šesti myší nebyl KT pozitivní a myši byly také bez klinických příznaků. Tato skupina šesti myší byla po 20. dnu od aplikace utracena a mozky byly vyšetřeny s negativním výsledkem.

Ve skupině č. III onemocnělo z 12 intramuskulárně infikovaných králíků po 14 až 19denní inkubační době 10 jedinců. Pozitivní KT předcházel u pěti zvířat prvním klinickým symptomům onemocnění. U čtyř byl pozitivní až první, čtvrtý a pátý den po objevení se symptomů. U dvou králíků byl KT po celou pozorovací dobu negativní, imunofluorescenční vyšetření mozku bylo rovněž negativní.

Závěrem lze konstatovat, že pozitivita KT předchází po *i. c.* aplikaci v 85 % případů a po *i. m.* aplikaci v 62 % případů klinické příznaky a přetrvává po celou dobu onemocnění.

DISKUSE

Předložená práce vychází z poznatků Schneidera (1969), Kovaleva a Šašenka (1970) o přítomnosti viru vztekliny v epiteliálních buňkách rohovky nemocných zvířat a o možnosti jeho detekce v otiskových preparátech technikou fluorescentních protilátek. Jmenovaní autoři tím potvrdili pozorování

uskutečněná Levaditim a Schoenem (1935), kteří zjistili v epiteliálních buňkách rohovky infikovaných zvířat cytoplazmatické inkluze.

V naší studii na skupině 20 intracerebrálně, 50 intramuskulárně infikovaných myší a na skupině 12 intramuskulárně infikovaných králíků byla intravitálně prokázána vysoká specifita imunofluorescenčního průkazu viru v otiskových preparátech oční rohovky. Specifická fluorescence je v souhlase se Schneiderem (1969), Kovalevem a Šašenkem (1970) vázána na epiteliální buňkách rohovky, ale podle našeho pozorování nemusí být antigen vázán na buňku v každém případě. V epiteliálních buňkách rohovky, vykazujících pozitivní fluorescenci, dochází v průběhu onemocnění ke zvýšení počtu fluoreskujících granul, popřípadě až k difúzní fluorescenci cytoplazmy. Fluoreskující granula dosahovala velikosti Babes-Negriho tělísek a u jednotlivých druhů zvířat nebyly pozorovány rozdíly v jejich formě a velikosti.

Z celkového počtu 70 intracerebrálně a intramuskulárně infikovaných myší byl virus detekován v epiteliálních buňkách rohovky u 64 jedinců, a to u 48 jedinců jeden až tři dny před zjištěním klinických příznaků, u 13 myší v době klinického onemocnění a pouze u tří myší jeden až dva dny po nástupu prvních příznaků onemocnění. Naproti tomu u králíků je počet zvířat s pozitivním KT před klinickými projevy onemocnění zřetelně nižší. Specifita KT je i u těchto zvířat průkazná, neboť negativní výsledky byly vázány pouze na zvířata bez klinických příznaků, u kterých imunofluorescenčním vyšetřením mozku nebyl virus rovněž prokázán. Máme-li na zřeteli skutečnost, že negativní výsledky KT nebyly v žádném případu spojeny s klinickými projevy onemocnění, je možné na tento test pohlížet jako na metodu, která v porovnání s nálezy Schneidera (1969), Kovaleva, Šašenka (1970) a Besedy (1972), zaručuje poměrně značnou spolehlivost při intravitálním průkazu antigenu. Schneider (1969) dosáhl u intracerebrálně infikovaných myší 93%, u intramuskulárně infikovaných myší 63 %spolehlivosti, Beseda (1972) na poměrně malém počtu hovězího dobytka 100% a Kovalev a Šašenko (1970) u experimentálně infikovaných ovcí také 100% spolehlivosti.

U sekčního materiálu z celkového počtu 21 uhynulé lišky s pozitivním imunofluorescenčním nálezem v mozku byl pozitivní KT pouze u 12 kusů, tj. v 57 %. V porovnání s výsledky intravitálního KT je toto procento zřetelně nižší a také v porovnání s údaji Besedy (1972) při vyšetřování sekčního materiálu (85,7 %) leží zřetelně níže. U tohoto poměrně malého počtu vyšetření jsme se nesetkali s pozitivním KT a negativním imunofluorescenčním vyšetřením mozku, jak uvádí Beseda (1972) u dvou případů. Poměrně velký rozdíl mezi detekcí viru v mozkové tkáni a v rohovkových buňkách je možné na jedné straně vysvětlit značnou obtížností až nemožností posoudit klinický stav, respektive fázi onemocnění, na druhé straně i častou nespecifickou fluorescenci spojenou s autolytickými pochody. Na nepříznivý vliv autolytických pochodů upozorňuje i Beseda (1972) u dubiózních výsledků, byť i jen u malého množství pěti případů ze 136 vyšetření. I když Beseda (1972) uvádí, že u otiskových preparátů ze sekčního materiálu stačí v porovnání s intravitálním KT k potvrzení infekce prohlédnout až 200 buněk v důsledku odlupování hlubších vrstev epitelu s nervovými buňkami, pro vyloučení infekce to nestačí. Pak autolytické pochody mohou být velkou překážkou pro jednoznačné posouzení KT.

Jestliže u sekčního materiálu při diagnostice vztekliny je vhodné KT zařadit jako pomocnou metodu, vždy ve spojení s imunofluorescenčním vyšetřením mozku a biologickým pokusem, v intravitální diagnostice představuje jedinou metodu, která usnadňuje orientaci a která by neměla být nikdy opomenuta.

Literatura

BESEDA M., 1972, Spoľahlivosť korneálneho testu pri diagnostike besnoty — porovnávacia štúdia. Vet. Čas. 4/XIV : 121-123.
DEAN D. J., 1966, The Fluorescent Antibody Test. Lab. Tech. in Rabies. WHO Monogr. 23 : 59-68.
KOVALEV N. A., ŠAŠENKO A. C., 1970, Imunofluorescentnyje issledovanija otpečatkov rogovicy pri bešenstve. Veterinarija 9 : 44-46.
LEVADITI C., SCHOEN R., 1935, Les corps de Negri dans le cytoplasme des épitheliums de la cornée. Annls Inst. Pasteur, Paris, 55 : 69-96.
SCHAAF J., SCHAAL E., 1968, Die Viruslokalisations bei Tollwut. Dte tierärztl. Wschr. 75 : 1315-1323.
SCHNEIDER L. G., 1969, The Cornea Test — a New Method for the Intravitum Diagnosis of Rabies. Zentbl. VetMed., B, 16, 1 : 24-26.

Došlo dne 18. 1. 1973

ГОРИНА Б., КАБЕЛИК В. (Центральный государственный ветеринарный институт, Прага, Чехословакия). **Проверка корнеального теста интравитальной диагностики бешенства у животных, проводимого на лабораторных животных.** Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 449-454, 1973.

Проверялась возможность интравитальной диагностики бешенства путем корнеального теста у лабораторных животных зараженных внутримозговым и внутримышечным способом. Для заражения использовался штамм, полученный при обычной диагностике лисы. Было установлено, что корнеальный тест положителен у каждого животного, заболевшего клиническим путем, и это осталось и после смерти. В цитоплазме положительных клеток, в начальные фазы заболевания, наблюдается мелкая желто-зеленая флуоресценция, которая возрастает после развития клинических симптомов. Находящийся вне клетки антиген показывает преимущественно точкообразную флуоресценцию. У 62 % внутримышечно зараженных мышей был установлен вирус бешенства раньше, чем появились первые клинические признаки.

бешенство; иммунофлуоресценция; корнеальный тест

HORYNA B., KABELÍK V. (Central State Veterinary Institute, Prague, Czechoslovakia). *Checking the Corneal Test Performed in Laboratory Animals for the Intravital Diagnosis of Rabies in Animals.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 449-454, 1973.

A trial was performed to check the possibility of the intravital diagnosis of rabies using a corneal test in laboratory animals infected through intracerebral and intramuscular applications. A strain obtained from a fox in current diagnosis was used for the infection. It was demonstrated that the corneal test was positive in each animal showing clinical signs of disease, and it remained positive even after death. A fine yellow-green fluorescence which increases with the development of the clinical signs is observed in the cytoplasma of positive cells at the first stages of disease. The antigen outside the cell shows mostly punctiform fluorescence. In 62 % of the mice infected intramuscularly, the virus was demonstrated sooner than the first clinical signs were observed.

rabies; immunofluorescence; corneal test

HORYNA B., KABELÍK V. (Zentralstaatsinstitut für Veterinärwesen, Praha, Tschechoslowakei). *Cornealtestnachprüfung auf Laboratoriumstieren zwecks intravitaler Tollwutdiagnostik bei Tieren.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 449-454, 1973.

Es wurde die Möglichkeit einer intravitalen Tollwutdiagnostik mit einem Cornealtest bei den mit einer intrazerebralen und intramuskulären Applikation infizierten Labortieren nachgeprüft. Zur Infektion wurde ein Stamm benützt, der bei einer gewöhnlichen Diagnostik von einem Fuchs gewonnen wurde. Es wurde nachgewiesen, daß der Cornealtest bei jedem Tier, das klinisch erkrankte, positiv ist,

und die Positivität überdauerte auch nach dem Exit. In den Anfangsstadien der Krankheit befindet sich in der Zytoplasma der positiven Zellen eine geringe gelbgrüne Fluoreszenz, die sich nach der Entwicklung der klinischen Symptome vergrößert. Das außerhalb der Zelle abgelagerte Antigen weist vorwiegend eine punktförmige Fluoreszenz auf. Bei 62 % der intramuskulär infizierten Mäuse wurde das Tollwutvirus noch bevor sich die ersten klinischen Symptome zeigten, nachgewiesen.

Tollwut; Immunofluoreszenz; Cornealtest

Adresa autorů:

MVDr. B. Horyna, MVDr. V. Kabelík, Ústřední státní veterinární ústav, 160 21 Praha 6-Suchdol, Na Vinici 156

ZMENY KURACÍCH EMBRYÍ PO APLIKÁCII BUNIEK INFIKOVANÝCH VÍRUSOM MARKOVEJ CHOROBY

E. Časnocha

Štátny veterinárny ústav, Zvolen

ČASNOCHA E. *Zmeny kuracích embryí po aplikácii buniek infikovaných vírusom Markovej choroby.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 455-463, 1973.

Bunky tkanivových kultúr, infikované vírusom Markovej choroby (M. ch.) boli inokulované do žĺtkových vakov (ŽV) a na chorioalantoidnú blanu (ChAM) kuracích embryí. Infikované bunky vírusom vyvolali tvorbu uzlíkov na CHAM a splenomegaliu embryí. Rovnaké zmeny na embryách sa dosiahli po transplantovaní buniek chorých kurčiat na M. ch., pokusne infikovaných vírusovým kmeňom Š-I, ako aj bunkami kurčiat z terénnych zamorených chovov M. ch. Vírus M. ch. sa v kuracích embryách (KE) pomnožuje a môže sa z nich spätne izolovať na tkanivových kultúrach (TK), resp. pasážovať na KE. Lyzovaný infikovaný bunkový materiál inokulovaný do ŽV a na ChAM nevyvoláva žiadne zmeny na orgánoch KE. V niekoľkých prípadoch transplantované neinfikované bunky, pochádzajúce zo zdravých kurčiat, tiež zapríčinili vznik uzlíkových zmien na ChAM; tieto zmeny boli histologicky nerozlíšiteľné od vírusových zmien. Po transplantovaní infikovaných buniek vírusom M. ch. a neinfikovaných buniek sú vo výsledkoch kvantitatívne rozdiely, ktoré sú diagnosticky použiteľné. Počet zmenených KE pri transplantačnej reakcii nepresahuje 33 %, naproti tomu pri špecifickej reakcii je vyššie percento zmien na inokulovaných KE.

Markova choroba; herpes-vírusy skup. B; vírusy viazané na bunku; izolácia vírusov na KE

Zo strát zapríčinených aviárnymi neoplaziami, viac ako 75 % pripadá na Markovu chorobu (M. ch.). Pripisuje sa to vysokej kontagióznosti ochorenia. M. ch. okrem príbuznosti patologicko-anatomického obrazu nesúvisí s lymfoidnou leukózou, najmä ak ochorenie posudzujeme z hľadiska pôvodcu a jeho vlastností (Purchase a kol. 1969, Vogel a kol. 1970). Pôvodcom M. ch. je herpesvírus skupiny B, t. j. asociovaný na bunku (Churchill a Biggs 1967, Eidson a kol. 1969).

Množenie vírusu sa darí na rôznych TK pripravovaných z aviárnych tkanív, ale tiež na kuracích embryách (KE), pri čom vírus vytvára na chorioalantoidnej membráne (ChAM) uzlíčkovité reakcie (Churchill 1968, Witter a kol. 1970, Katz a Kohn 1971, Biggs a Milne 1971, Bamberger 1972). Autori infikovali KE vírusom M. ch. asociovaný na krvinky, slepačie obličkové a kačacie fibroblastické bunky. Obdobné zmeny na KE, ale s voľným bezbunkovým vírusom M. ch., vyvolal Evans a kol. (1971). Von Bülow (1968, 1969) vypracoval pre priamu detekciu vírusu M. ch. metódu „žĺtkového vaku". Uzlíkovité zmeny vzniknuté na ChAM po aplikácii buniek z chorých kurčiat do žĺtkového vaku (ŽV) kuracích embryí považuje za špecifické, vyvolané

vírusom M. ch. Výsledky diskusie na konferencii o M.ch., konanej v Las Vegas (Anonym 1970), odporúčajú použiť KE pri určení ochorenia, najmä aplikáciu inokula do ŽV, pri tom upozorňujú na to, že ak inokulum obsahuje krv alebo imunokompetentné bunky a aplikuje sa priamo na ChAM, môže vzniknúť transplantačná reakcia. Tiež pri intravenóznom vpravení takýchto buniek môže vzniknúť uvedená reakcia, ako to sledoval vo svojej práci Cain a kol. (1968). Popis zmien — uzlíkov na ChAM a zväčšenie sleziny KE — vyvolaných účinkom vírusu M. ch. a imunitnou reakciou štepu proti príjemcovi (graft versus host) sa nápadne zhoduje. Jaffe (1966) medzi iným uvádza uzlíčky na ChAM a splenomegaliu ako kritériá reakcie „graft v. host".

V predloženej práci je snaha o preskúšanie použiteľnosti KE pre priamu etiologickú diagnostiku M. ch. Niekoľkými pokusmi chceme podporiť názor, že zmeny na infikovaných embryách sú vírusového pôvodu, majú špecifický charakter, a preto pozitívny nález za určitých podmienok je diagnosticky použiteľný.

MATERIÁL A METÓDY

Vnímavé KE sme používali výlučne z jedného chovu nosníc D., kde M. ch. nebola pozorovaná. Sú to nosnice plemena hampshire. V násadových vajciach neboli zistené precipitačné protilátky proti antigénu M. ch.

Ako vírus sme používali bunkové suspenzie z orgánov kurčiat vyliahnutých v laboratóriu, pochádzajúcich z uvedeného chovu D., ktoré boli infikované vírusom akútnej formy M. ch. Vírus bol izolovaný na tkanivových kultúrach (TK) kuracích obličkových buniek z importovaných kurčiat línie G 65 r. 1970, označený Š-I (Časnocha a Salaj 1972).

Pre účely tejto práce sme odoberali z kurčiat:

1. citrátovú krv (3,8% nátriumcitrát 1 : 4), ktorú sme aplikovali do KE celú, alebo sme plazmu odstránili šetrnou centrifugáciou. Krvinky sme 2× premyli v PBS a sediment krviniek sme resuspendovali do pôvodného objemu médiom podľa Parkera s antibiotikami (300 m. j. PNC, a 300 μg STM/1 ml);

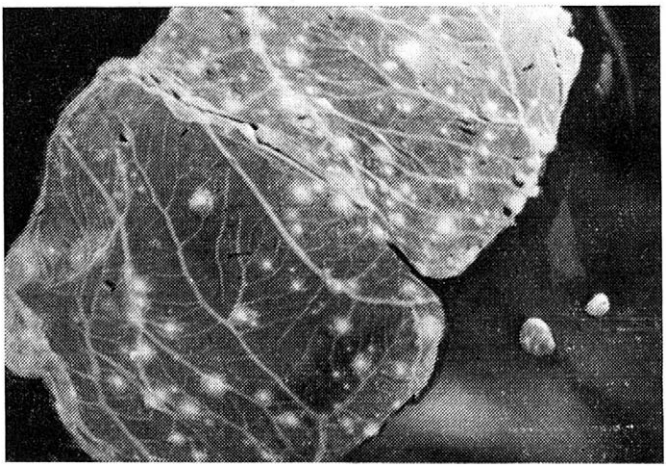
2. slezinu resp. tumory (gonád, obličiek a pod.), z ktorých sme pripravili bunkovú suspenziu zvyčajným spôsobom — trypsinizáciou (0,05% trypsín-Bioveta Terezín). Počítanie buniek v suspenzii sme robili v Bürkerovej komôrke po predchádzajúcom farbení trypanovou modrou. Koncentráciu živých (nezafarbených) buniek v inokulu sme upravili na cca 10^6/0,2 ml pomocou média podľa Parkera (ÚSOL). K výslednému objemu sme pridali antibiotiká v dávkach ako pri krvi;

3. kostnú dreň, ktorú sme kyretkou vyškrabali z asepticky vypreparovanej a rozstrihanej stehnovej kosti. Trypsinizácia a ďalší postup bol ako pri slezine.

Inokulum z infikovaných buniek TK s výrazným cytopatickým efektom (CPE) sa pripravuje prevedením kultúr do suspenzie 0,1% trypsin-verzénom, potom nasleduje centrifugácia, resuspendovanie v médiu pre TK Parker a úprava počtu živých buniek na 10^6/0,2 ml.

Kuracie embryá sme infikovali bežnými spôsobmi virologickej praxe, ihneď po príprave inokula. Pre aplikáciu do ŽV sme použili 4—5dňové KE a na ChAM 9—11dňové. Jednu suspenziu vyšetrovaných buniek sme očkovali na 10 KE.

Lyzovaný bunkový materiál sme pripravili dvojnásobným zmrazením a rozmrazením 2 × 10^6 infikovaných buniek v 0,2 ml a nasledujúcou centrifugáciu



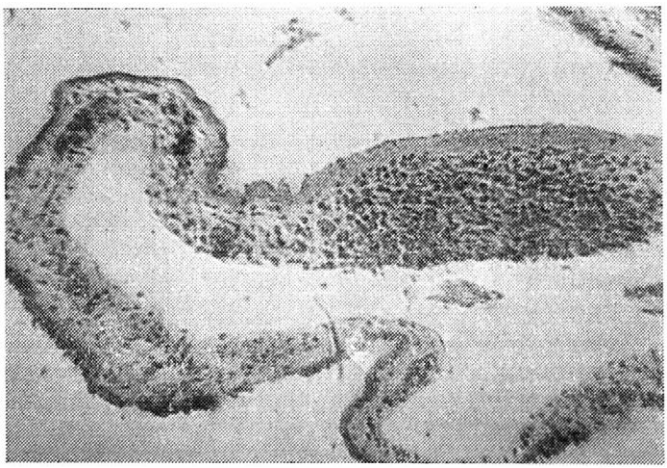
1. Uzlíky na ChAM a zväčšená slezina z KE infikovaného vírusom M. ch. Pre porovnanie — druhá slezina je normálna z neinfikovaného embrya

suspenzie pri 15 000 obr/min po dobu 20 min. Supernatant pre inokuláciu KE sme odsali striekačkou.

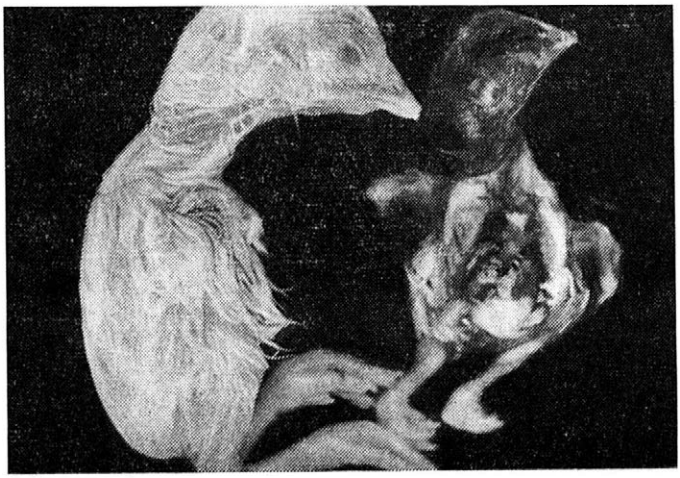
Inokulum na jedno KE predstavovalo 0,2 ml citrátovej alebo premytej krvi chorých zvierat, alebo 0,2 ml slezinových či nádorových buniek (živých, nefarbiacich sa trypanovou modrou). Zmeny jednotlivých orgánov sa hodnotia dva až tri dni pred liahnutím. Očkovanie prežíva 70—80 % KE.

VÝSLEDKY

Pri hodnotení inokulovaných KE sme v pozitívnych prípadoch nachádzali najintenzívnejšie zmeny na ChAM vo forme diseminovaných bielych uzlíkov po celom povrchu (obr. 1), ktorých počet niekedy prevyšuje 1000. Za pozitívny nález sme považovali viac ako 20 uzlíkov na jednej blane. Mikroskopicky na ChAM sa pozoruje hyperplazia ektodermy, prípadne aj entodermy, prípadne ich skvamózna metaplazia. Keratínové ložiská sme pozorovali v niektorých ChAM v mezoderme, ktorá je edematózna a infiltrovaná mononukleárnymi elementami a fibroblastami (obr. 2).



2. Histologický rez ChAM pozitívneho embrya. Infiltrácia blany bunkovými elementami. Farbenie H. E.



3. Zakrpatenosť a ložiskové zmeny pečene infikovaného embrya v porovnaní s neinfikovaným KE (19. deň inkubácie)

Ďalším orgánom, u ktorého častosť výskytu zmien a ich intenzita je takmer v priamej korelácii so zmenami na ChAM (tab. III), je slezina. Okrem splenomegalie máva slezina na svojom povrchu žltopomarančové uzlíky (obr. 1).

Len zriedkavým nálezom sú žlto-biele uzlíky na neoperených častiach kože, behákoch, v okolí zobáka a v pečeni KE. Tiež sa vyskytujú hrubé uzlovité reakcie v mieste aplikácie inokula na ChAM, prípadne silný edém blany a zakrpatenosť embrya (obr. 3). V tabuľkách ich označujeme ako „iné zmeny".

V pokusoch chceme najprv vylúčiť nešpecifické reakcie. Predpokladáme, že najmenšia pravdepodobnosť vzniku transplantačnej reakcie bude pri použití vírusu asociovaného na embryonálne epiteliálne alebo fibroblastické bunky, ktoré nie sú imunologicky kompetentné. Niekoľko kmeňov vírusu M. ch., kultivova-

I. Inokulácia KE infikovanými bunkami tkanivových kultúr

Inokulum (druh TK)	Kmeň vírusu	Počet buniek v dávke	Miesto aplikácie	Výsledok — zmeny na KE		
				uzlíky na ChAM	splenomegalia	iné zmeny
KEOB	Š-1	cca 10^6	ŽV	9/10	4/10	1/10
KEOB	Š-1	cca 10^6	ChAM	7/8	1/8	1/8
KEOB	152/71	cca 10^6	ŽV	3/6	3/6	0/6
KAEB	Š-1	cca 10^6	ŽV	6/10	6/10	2/10
KAEB	THV-Bio-1	cca 10^6	ChAM	7/8	N	N
KAEB	THV-Bio-1	cca 10^6	ŽV	8/12	N	N
KAEB	neinfik.	cca 10^6	ChAM	0/10	0/10	2/10
KEOB	neinfik.	cca 10^6	ChAM	0/10	0/10	1/10
KEOB	neinfik.	cca 10^6	ŽV	0/7	0/7	0/7

Legenda: KEOB — kuracie embryonálne obličkové bunky. KAEB — kačacie embryonálne bunky. Kmeň Š-1 a 152/71 sú vírusy akútnej M. ch., kmeň THV-Bio-1 je vakcinačný vírus Biovety Nitra. Vo výsledkoch číslo v čitateli je počet KE s pozitívnymi reakciami, číslo v menovateli je celkový počet posúdených KE; N-nesledované

II. Inokulácia bunkového a bezbunkového materiálu z klinicky chorých (vírus Š-I) a notoricky zdravých kurčiat do kur. embryí

Inokulum zo zvierat	Druh inokulovaného materiálu	Dávka na 1 KE	Miesto aplikácie	Výsledok — zmeny na KE					
				uzlíky na ChAM	% pozitívnych	splenomegalia	% pozitívnych	iné zmeny	% pozitívnych
Choré kurčatá	krv (citrátová)	0,2 ml	ŽV	10/15	66,6	9/15	60,0	3/15	20,0
Choré kurčatá	krv (citrátová)	0,2 ml	ChAM	7/11	63,6	5/11	45,4	3/11	27,0
Choré kurčatá	bunky sleziny	10^6/0,2	ŽV	6/12	50,0	6/12	50,0	1/12	8,3
Choré kurčatá	bunky kostnej drene	10^6/0,2	ŽV	6/10	60,0	6/10	60,0	1/10	10,0
Choré kurčatá	lyzované bunky sleziny	0,2 ml	ChAM	0/9	0,0	0/9	0,0	0/9	0,0
Choré kurčatá	plazma (citrátová)	0,2 ml	ŽV	0/7	0,0	0/7	0,0	0/7	0,0
Zdravé kurčatá	krv (citrátová)	0,2 ml	ChAM	3/12	25,0	4/12	33,3	1/12	8,3
Zdravé kurčatá	krv (citrátová)	0,2 ml	ŽV	0/10	0,0	2/10	20,0	1/10	10,0
Zdravé kurčatá	bunky sleziny	10^6/0,2	ChAM	4/18	22,2	6/18	33,3	1/18	5,5
Zdravé kurčatá	bunky sleziny	10^6/0,2	ŽV	2/8	25,0	2/8	25,0	2/8	25,0
Zdravé kurčatá	bunky kostnej drene	10^6/0,2	ŽV	1/5	20,0	1/5	20,0	0/5	0,0

Legenda: Vo výsledkoch číslo v čitateli vyjadruje KE s pozitívnymi zmenami (napr. nad 20 uzlíkov na ChAM), v menovateli je celkový počet posúdených embryí

III. Izolácia vírusu na KE inokuláciou buniek z orgánov klinicky chorých kurčiat z 10 terénnych chovov napadnutých M. ch.

Inokulum-vyšetrovaný orgán	Miesto aplikácie	Výsledok — zmeny na KE			Súhrnný výsledok	
		uzlíky ChAM	splenomegalia	iné zmeny	pozitívne celkom	v %
Krv (citrátová)	ŽV	75/145	67/145	38/145	80/145	55,1
Sleziny (trypsínove)	ŽV	76/131	56/131	38/131	78/131	60,1
Sleziny (trypsínove)	ChAM	14/22	12/22	10/22	14/22	
Nádory (trypsínove)	ŽV	19/26	15/26	7/26	19/26	73,8
Nádory (trypsínove)	ChAM	12/16	10/16	6/16	12/16	
Kostná dreň (trypsínová)	ŽV	14/18	13/18	6/18	14/18	77,7
Úhrnom:		210/358 (58,6 %)	173/358 (48,3 %)	105/358 (29,6 %)	217/358 (60,6 %)	
Krv notoricky zdravých kurčiat	ŽV	0/18	0/18	4/18	0/18	0,0

Legenda: Z každého chovu vyšetrených tri až päť kurčiat. Čísla v čitateli sú KE s pozitívnym nálezom zmien, v menovateli je celkový počet embryí, ktoré inokuláciu buniek prežili a boli posúdené

ného na kuracích embryonálnych obličkových bunkách (KEOB) a na kačacích embryonálnych bunkách (KAEB), sme inokulovali do ŽV a na ChAM. Výsledok pokusu je v tab. I. Uzlíčkovité reakcie na ChAM vznikli výlučne v tom prípade, ak bunkové kultúry obsahovali vírus M. ch.

Výsledky v tab. II poukazujú na to, že v ojedinelých prípadoch aj od notoricky zdravých kurčiat transplantované bunky na ChAM a do ŽV vyvolávajú vznik uzlíčkov na ChAM. Tie sa nedajú histologicky oddiferencovať od zmien vyvolaných infikovanými bunkami vírusom M. ch. Medzi výsledkami vyšetrenia zdravých a infikovaných kurčiat sú najmä kvantitatívne rozdiely. Predpokladáme, že zmeny na ChAM a splenomegalia, vzniknuté po aplikácii buniek z notoricky zdravých kurčiat, sú výsledkom reakcie štepu proti príjemcovi. Táto reakcia môže vzniknúť aj pri aplikácii donorových buniek do ŽV a nie len pri aplikácii intravenóznej a na ChAM.

Reizoláciu vírusu z infikovaných KE (kmeň Š-I) sme previedli tým spôsobom, že z embryí, ktoré mali uzlíky na blanách, sme vybrali obličky a z nich pripravili kultúry obličkových buniek (KEOB). Prítomnosť pozdného a charakteristického CPE bola kritériom pozitivity záchytu vírusu M. ch. Z dvanástich založených kultivácií KEOB bol CPE pozitívny v 8 prípadoch, t. j. v 66 %.

Z embryí inokulovaných bunkami z notoricky zdravých zvierat sme napriek výskytu uzlíkových reakcií na ChAM žiaden CPE na KEOB nedostali.

Trypsinizáciou uvoľnené bunky ChAM a sleziny z pozitívnych vírusom infikovaných KE sme inokulovali opäť do ŽV štvordňových KE. V troch pokusoch o pasážovanie sa podarila raz I. a raz II. pasáž. Tieto bunky sú infekčné pre kurčatá, lebo u 5 pokusných kurčiat (2×10^6 živých buniek *i. p.* — kmeň Š-I) vyvolali vznik M. ch.

Overenie metódy izolácie vírusu M. ch. na KE z terénneho materiálu je v tab. III. V 10 chovoch bolo klinicky a patohistologicky stanovené podozrenie

na M. ch. Izolačnými pokusmi na TK sme potvrdili prítomnosť vírusu M. ch. a príslušnými metódami sa vylúčili: pseudomor, laryngotracheitída, bronchitída, sypanice a mykoplazmóza. Krv chorých kurčiat po inokulácii do ŽV dávala 55,1 %, bunky sleziny pri oboch spôsoboch očkovania (ChAM a ŽV) 60,1 %, bunky tumorov 73,8 % a kostnej drene 77,7 % pozitívnych výsledkov. Očkovanie prežilo a bolo posúdených 358 KE, z čoho 60,6 % KE malo pozitívny nález uzlíčkov na ChAM resp. splenomegaliu. Tab. III je súhrnná a rozpis jednotlivých výsledkov nepredkladáme; preto je treba poznamenať, že sa vyskytli prípady, kedy zo zvierat chorých na M. ch. s pozitívnym nálezom CPE na TK boli negatívne výsledky na KE. Niekedy negatívny výsledok na KE nasledoval po predchádzajúcom pozitívnom (napr. opakovaný odber krvi). Z toho uzatvárame, že negatívny výsledok vyšetrenia na KE nevylučuje prítomnosť vírusu M. ch. v organizme kurčiat.

Z diagnostického hľadiska je vhodné za pozitívny výsledok vyšetrenia (potvrdzujúci M. ch.) brať nález špecifických zmien u viac ako 35 % infikovaných KE. Do 33 % KE bolo zmenených aj v prípade inokulácie buniek z notoricky zdravých kurčiat (tab. II).

DISKUSIA

Embryonálny organizmus pri stretnutí s cudzími, ale druhovo totožnými bunkami počas svojej imunologickej nezrelosti nerozlišuje ich ako cudzie a neodpovedá imunologickou reakciou. V našom prípade by sa nemuselo jednať o reakciu zo strany embrya, ale o reakciu zo strany transplantovaných buniek imunologicky zrelých, proti recipientnému embryu. Podľa Coopera a kol. (1966) sú malé lymfocyty základom bunkovej imunity; sú to bunky imunologicky kompetentné. Po ich transplantovaní do KE môže nastať tolerancia, ale môže dôjsť k pomalej deštrukcii príjemcu. Táto reakcia štepu proti príjemcovi sa dá určiť podľa stupňa splenomegalie a počtu bielych uzlíkov na ChAM a závisí medzi iným na počtu transplantovaných stredných a malých lymfocytov (Szenberg-Warner 1962, cit. Jaffe 1966).

Popri týchto poznatkoch je známa analogická odpoveď KE aj na niektoré vírusy, mikróby a protozoárne parazity. Významné kvantitatívne rozdiely, ktoré sme obdržali na KE po inokulácii buniek z notoricky zdravých oproti infikovaným kurčatám, je treba brať do úvahy. Bunkami neinfikovanými vírusom M. ch. sme dosiahli zmeny len u 0—33 % KE.

Pokusmi s pasážovaním vírusu M. ch. zo zmenených orgánov infikovaných KE, ako aj transplantovaním infikovaných buniek embryonálnych TK sme čiastočne vylúčili možnosti vzniku reakcie štepu proti príjemcovi. Potvrdili sme názor, že sa jedná o špecifickú reakciu. To je v súlade s poznatkami Churchilla 1968, Bülowa 1969, Wittera a kol. 1970 a Katza a Kohna 1971. Tento názor tiež podporuje pokus o reizoláciu vírusu M. ch. z embryí infikovaných a vykazujúcich zmeny na ChAM. Reizolácia bola úspešná na TK i na pokusných kurčatách.

Evans a kol. (1971) so svojou prácou, pri ktorej použil voľný bezbunkový vírus, najviac potvrdil schopnosť vírusu M. ch. vyvolávať na ChAM a v parenchymatóznych orgánoch KE zmeny totožné s hore popísanými. Kým nebude možné získávať v bežnej diagnostickej praxi z patologického materiálu voľný bezbunkový vírus M. ch., budú sa používať KE ako pomocné vyšetrenie, pri čom rozhodujúci zostane nález izolácie vírusu M. ch. na tkanivových kultúrach.

Technicky spolupracovali: M. Katreniaková a M. Koppalová.

Literatúra

ANONYM, 1970, Methods in Marek's disease research. Avian Dis. 14, 4 : 820-828.

BAMBERGER K., 1972, A Marek-féle betegség vírusának kimutathatósága fiasított tyúktojás oltásával. Magy. Állatorv. Lap. 27, 6 : 312-318.

BIGGS P. M., MILNE B. S., 1971, Use of the embryonating eggs in studies on Marek's disease. Am. J. Vet. Res. 32, 11 : 1795-1809.

BÜLOW V., 1968, Untersuchungen mit embryonierten Eiern bei der Marek'schen Hühnerlähmung. Berl. Münch. tieräztl. Wschr. 81, 18 : 365-367.

BÜLOW V., 1969, Marek'sche Hühnerlähmung: Reaktionen im experimentell infizierten embryonierten Ei. Zentbl. VetMed., B, 16 : 97-114.

CAIN W. A., COOPER M. D., GOOD R. A., 1968, Cellular immune competence of spleen bursa thymus cells. Nature 217, 6 : 87-89.

COOPER M. D., PETERSON R. D. A., SOUTH M. A., GOOD R. A., 1966, The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. J. exp. Med. 123, 1 : 75-102.

ČASNOHA E., SALAJ J., 1972, Štúdium vlastností cytopatogenného agens izolovaného na tkaninových kultúrach z hydiny s príznakmi Markovej choroby. Vet. Med. (Praha) 7, 7 : 429-436.

EIDSON C. S., RICHEY D. J., SCHMITTLE S. C., 1969, Studies on acute Marek's disease. XI. Propagation of the GA isolate of Marek's disease in tissue culture. Avian dis. 13, 3 : 636-653.

EVANS D. I., PATTERSON U. I., BEASLEY J. N., 1971, Pathological response of the chicken embryo to an agent which causes acute leukosis (Marek's disease). Appl. Microbiol. 21 : 321-326.

CHURCHILL A. E., BIGGS P. M., 1967, Agent of Marek's disease in tissue culture. Nature 215 : 528-530.

CHURCHILL A. E., 1968, Herpes-type virus isolated in cell culture from tumors of chickens with Marek's disease. I Studies in cell culture. J. natn. Cancer Inst. 41, 4 : 939-950.

JAFFE W. P., 1966, Avian immunobiology. Poult. Sci. 45, 1 : 109-118.

KATZ D., KOHN A., 1971, Isolation and identification of Marek's disease herpesvirus by yolk-sak inoculation method. Avian Dis. 15, 1 : 187-198.

PURCHASE H. G., SOLOMON J. J., JOHNSON D. C., 1969, Avian leucosis-sarcoma viruses and antibody in field flocks, and their relationship to „leucosis" mortality. Avian Dis. 13, 1 : 58-71.

VOGEL K., BEYKR J., WERNER O., URBANECK D., 1970, Die akute Marecksche Krankheit des Huhns. Mh. VetMed. 25, 6 : 239-246.

WITTER R. L., NAZERIAN K., PURCHASE H. G., BURGOYNE G. H., 1970, Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. Am. J. vet Res. 31, 3 : 525-538.

Došlo dne 16. 10. 1972

ЧАСНОХА Е. (Государственный ветеринарный институт, Зволен, Чехословакия). **Изменения куриных эмбрионов после трансплантации клеток зараженных вирусом болезни Марека.** Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 455-463, 1973.

Клетки тканевых культур, зараженных вирусом болезни Марека, были инокулированы в желтковые оболочки и в хориолантоическую пленку куриных эмбрионов. Зараженные вирусом клетки вызвали узлообразования в хориоалантоической пленке и спленомегалии эмбриона. Такие же изменения эмбрионов наступили после трансплантации клеток больных цыплят болезнью Марека, опытно зараженных вирусным штаммом Ш-I, а также клеток цыплят из зараженных стад болезнью Марека на местах. Вирус болезни Марека в эмбрионах цыплят размножается и они могут обратно изолироваться на тканевые культуры, т. е. пассажно распределяется на эмбрионах цыплят. Лизированный зараженный клеточный материал, инокулированный в желтковые мешочки и в хориоалантоические пленки, не вызывает никаких изменений в органах эмбрионов цыплят. В нескольких случаях трансплантированные незараженные клетки здоровых цыпят также вызвали узлообразование в хориоалантоической пленке, которые гистологически не различались от вирусовых изменений. После трансплантации зараженных клеток вирусом болезни Марека и незараженных клеток,

установлены количественные различия, которые можно применить в диагностике. Количество изменившихся эмбрионов цыплят при трансплантационной реакции не превышает 33 %, наоборот, при специфической реакции процент изменений выше в инокулированных эмбрионах цыплят.

болезнь Марека; герпес-вирусы группы B; вирусы связанные с клетками; изоляция вирусов на эмбрионах цыплят

ČASNOCHA E. (State Veterinary Institute, Zvolen, Czechoslovakia). *Changes in Chick Embryos after the Application of Cells Infected with Marek's Disease Virus.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 455-463, 1973.

Tissue culture cells infected with the virus of Marek's disease (M. d.) were inoculated to the yolk sacs (YS) and to the chorialantoid membrane (CAM) of chick embryos. The virus-infected cells evoked the formation of nodules on CAM and splenomegalium of embryos. The same changes in embryos were obtained after the transplantion of cells of M. d.-affected chicken, experimentally infected with the virus strain Š-I and with the cells of chicken from flocks naturally infested with M. d. The virus multiplies in chick embryos (CE); it can be reisolated on tissue cultures (TC), or passaged on CE. The lysed infected cell material inoculated to the YS and on CAM does not produce any changes in CE organs. In some cases, transplanted uninfected cells coming from helthy chicken also caused the occurrence of nodular changes on CAM which were histologically the same as the virus changes. After the transplantation of M. d.-infected and uninfected cells, the results show quantitative differences bearing diagnostic importance. The number of CE changed during the transplantation reaction does not exceed 33 %; on the other hand, the specific reaction entails a higher percentage of changes on inoculated CE.

Marek's disease; herpes-viruses of the group B; cell-bound viruses; isolation of viruses on CE

ČASNOCHA E. (Staatliches Veterinärinstitut, Zvolen, Tschechoslowakei). *Veränderungen der Kükenembryonen nach der Applikation der vom Virus der Marekschen Hühnerlähme infizierten Zellen.* Vet. Med. (Praha) 18 (7) : 455-463, 1973.

Die vom Virus der Marekschen Hühnerlähme infizierten Zellen der Gewebekulturen wurden in die Eidottersäcke und auf die chorioalantoische Haut der Kückenembryonen inokuliert. Die von Virus infizierten Zellen haben die Bildung von Knötchen auf der chorioalantoischen Haut (ChaH) und dem Splenomegalium der Embryonen hervorgerufen. Dieselbe Veränderungen in den Embryonen wurden nach der Zellentransplantation der von Marekschen Hühnerlähme (M. H.) betroffenen Kücken erreicht, die versuchsweise vom Virusstamm Š-I, und von Kükenzellen aus den von M. H. verseuchten Zuchten infiziert worden waren. Der Virus der Marekschen Hühnerlähme vermehrt sich in den Kükenembryonen und kann von denen regressiv auf den Gewebekulturen isoliert werden, bzw. auf Kükenembryonen übertragen werden. Das lysierte, infizierte, in Eidottersack und ChaM inokulierte Zellenmaterial ruft keine Veränderungen in Organen der Kükenembryonen hervor. In einigen Fällen haben die transplantierten, nicht infizierten, von gesunden Küken stammenden Zellen auch das Entstehen von Knötchen auf der ChaM verursacht, die von den Virusänderungen histologisch nicht zu unterscheiden waren. Nach der Transplantation der vom Virus der M. H. infizierten Zellen und der nicht infizierten Zellen bestehen in den Ergebnissen Unterschiede, die diagnostisch anwendbar sind. Die Anzahl von veränderten Kükenembryonen bei der Transplantationsreaktion reicht nicht über 33 % hinaus, während bei der spezifischen Reaktion ist der Prozentsatz von Veränderungen auf den inokulierten Kükenembryonen höher.

Mareksche Hühnerlähme; Herpes-Viren Gruppe B; zellengebundene Viren; Virenisolierung auf Kükenembryonen

Adresa autora:

MVDr. E. Časnocha, CSc., Štátny veterinárny ústav, 960 86 Zvolen

Rukopis odevzdán k tisku 24. 4. 1973 – Podepsáno k tisku 16. 8. 1973

OBSAH

Král E., Němeček L., Pavlica J., Roztočil V.: Anestézie hydrochloridem ketaminu u psů 397
Doležel F., Bartoš S., Jukl A.: Účast protozoální populace na fermentaci lipidů v bachoru 409
Várady J., Boďa K., Bajo M., Szanyiová M., Tomáš J.: Výmenné procesy dusíka medzi krvou a bachorobým obsahom u oviec pred a po krmení . . . 417
Dvořák M., Ševčík B., Reichel F., Plíšek K.: Oxymykoin^{R} SPOFA *plv. solub. ad usum vet.*-toxicita, rezidua a klinické hodnocení 425
Škaloud J., Vyhnálek J., Vlasák J., Vlasáková J.: Klinické ověření účinnosti přípravku Linco-Spectinu 100 k tlumení CRD u kuřat 431
Lenártová V., Šamo A., Teleha M., Holovská K., Bartík M.: Výskyt diferencovaných aminopeptidáz v krvných sérach 441
Horyna B, Kabelík V.: Ověření korneálního testu na laboratorních zvířatech k intravitální diagnostice vztekliny u zvířat 449
Časnocha E.: Zmeny kuracích embryí po aplikácii buniek infikovaných vírusom Markovej choroby . . 455

СОДЕРЖАНИЕ

Крал Э., Немечек Л., Павлица Й., Розточил В.: Анестезия гидрохлоридом кетамина у собак 408
Долежел Ф., Бартош С., Юкл А.: Участие протозоальной популяции в ферментации липидов в рубце 415
Варады Й., Бодя К., Байо М., Саниова М., Томаш Н.: Процессы обмена азота между кровью и рубцовым содержанием у овец перед и после кормления 423
Дворжак М., Шевчик Б., Райхел Ф., Плишек К.: *Oxymykoin*^{R} *SPOFA plv. solub. ad usum vet.* — токсичность, остатки и клиническая оценка 429
Шкалоуд Й., Выгналек Й., Власак Й., Власакова Й.: Клиническая проверка эффективности препарата Линко-Спектина 100 для подавления CRD у 217 цыплят 439
Ленартова В., Шамо А., Телега М., Головска К., Бартик М.: Наличие дифференцированных аминопептидаз в сыворотках крови 447
Горина Б., Кабелик В.: Проверка корнеального теста интравитальной диагностики бешенства у животных, проводимого на лабораторных животных . . . 453
Часноха Е.: Изменения куриных эмбрионов после трансплантации клеток зараженных вирусом болезни Марека 562

CONTENTS

Král E., Němeček L., Pavlica J., Roztočil V.: Anaesthesia through Ketamine Hydrochloride in Dogs 408
Doležel F., Bartoš S., Jukl A.: Participation of Protozoal Population at the Fermentation of Lipids in the Omasum 416
Várady J., Boďa K., Bajo M., Szaniyová M., Tomáš J.: The Nitrogen Exchange Processes between Blood and Rumen Content in Sheep before and after Feeding 423
Dvořák M., Ševčík B., Reichel F., Plíšek K.: Oxymykoin^{R} SPOFA *plv. solub. ad usum vet.* — Toxicity, Residua and Clinical Evaluation . 430
Škaloud J., Vyhnálek J., Vlasák J., Vlasáková J.: Clinical Checking of the Effectiveness of the Preparation Linco-Spectin 100 for Subduing of CRD in Chicken 439
Lenártová V., Šamo A., Teleha M., Holovská K., Bartík M.: The Occurrence of Differentiated Aminopeptidases in Blood Serums . . 447
Horyna B., Kabelík V.: Checking the Corneal Test Performed in Laboratory Animals for the Intravital Diagnosis of Rabies in Animals . . . 453
Časnocha E.: Changes in Chick Embryos after the Application of Cells Infected with Marek's Disease Virus 563

INHALT

Král E., Němeček L., Pavlica J., Roztočil V.: Anästhesie durch Ketaminhydrochlorid bei Hunden 408
Doležel F., Bartoš S., Jukl A.: Teilnahme der protozoalen Population an der Lipidenfermentation im Pansen 416
Várady J., Boďa K., Bajo M., Szanyiová M., Tomáš J.: Austauschprozesse des Stickstoffs zwischen dem Blut und Panseninhalt bei Schafen vor und nach der Fütterung 423
Dvořák M., Ševčík B., Reichel F., Plíšek K.: Oxymykoin^{R} SPOFA *plv. solub. ad usum vet.* — Toxizität, Überreste und klinische Beurteilung 430
Škaloud J., Vyhnálek J., Vlasák J., Vlasáková J.: Klinische Nachprüfung der Wirksamkeit des Präparates Linco-Spection 100 zur Dämpfung von CDR bei Küken 439
Lenártová V., Šamo A., Teleha M., Holovská K., Bartík M.: Vorkommen von differenzierten Aminopeptidasen in Blutseren . . . 448
Horyna B., Kabelík V.: Cornealtestnachprüfung auf Laboratoriumstieren zwecks intravitales Tollwutdiagnostik bei Tieren 453
Časnocha E.: Veränderungen der Kükenembryonen nach der Applikation der vom Virus der Marekschen Hühnerlähme infizierten Zellen . . . 563

TABLE DES MATIÈRES

Král E., Němeček L., Pavlica J., Roztočil V.: L'anestésie au chlorhydrate de kétamine chez les chiens (res. An, Al/408)
Doležel F., Bartoš S., Jukl A.: Participation des protozoaires à la fermentation des lipides dans le rumen (res. An, Al/416)
Várady J., Boďa K., Bajo M., Szanyiová M., Tomáš J.: Procédés de changement de l'azote entre le sang et le contenu du rumen des ovins avant et après l'alimentation (res. An, Al/423)
Dvořák M., Ševčík B., Reichel F., Plíšek K.: Oxymykoin^{R} SPOFA *plv. solub. ad usum. vet.* — toxicité, résidus, évaluation clinique (res. An, Al/430)
Škaloud J., Vyhnálek J., Vlasák J., Vlasáková J.: Vérification clinique de l'efficacité du produit Linco-Spectin 100 destiné à inhiber la CRD (maladie chronique de respiration) des poussins (res. An, Al/439)
Lenártová V., Šamo A., Teleha M., Holovská K., Bartík M.: Présence des aminopéptidases différenciées dans les sérums sanguins (res. An/447, Al/448)
Horyna B., Kabelík V.: Vérification du test cornéal sur les animaux de laboratoire en vue du diagnostic intrevital de la rage chez les animaux (res. An, Al/453)
Časnocha E.: Modifications des embryons de poussins dues à l'application des cellules infectées au virus de la Maladie de Marek (res. An, Al/563)

Rozšiřuje Poštovní novinová služba. Objednávky a předplatné přijímá PSN - ústřední expedice tisku, administrace odborného tisku, Jindřišská ulice 14, 120 00 Praha 1. Lze též objednat u každé pošty i poštovního doručovatele. Objednávky do zahraničí vyřizuje PNS - ústřední expedice tisku, oddělení vývozu tisku, Jindřišská ulice 14, 110 00 Praha 1. Vytiskl MÍR, novinářské závody, n. p., závod 6, Legerova ulice 22, 120 00 Praha 2.