

VĚDECKÝ ČASOPIS

12/27



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

10-11

ROČNÍK 20 (XLVIII)
PRAHA
ZÁŘÍ 1975
CENA 20 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

Rídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král (předseda), prof. MVDr. Kolo-
man Boďa, DrSc., doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr.
Jaroslav Dražan, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., MVDr.
Miloš Halaša, CSc., prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc., doc.
MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., 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 Václavíková

© Ústav vědeckotechnických informací, Praha 1975

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

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

■
The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publishes
studies, analyses and scientific treatises about the solved
research tasks in the line of the veterinary medicine. Pu-
blished by the Institute of Scientific and Technical Inform-
ation. Issued monthly. Editorial office 120 56 Prague 2,
Slezská 7.

■
Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Ab-
handlungen über die gelösten Forschungsaufgaben auf dem
Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben von Institut
für wissenschaftlich-technische Informationen. Erscheint mo-
natlich. Redaktion 120 56 Prag 2, Slezská 7.

■
La journal scientifique VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publie
les études, analyses et traités scientifiques concernant les
tâches de recherches résous dans le domaine de médecine
vétérinaire. Publie par l'Institut des Informations Scienti-
fiques et Techniques. Paraît une fois par mois. Rédaction
120 56 Prague 2, Slezská 7.

IZOLACE A IDENTIFIKACE VIRU BOVINNÍ VIROVÉ DIARRHOEY – SLIZNIČNÍ CHOROBY (BVD-MD) V ČSR

A. Čepica, J. Menšík, Z. Pospíšil, P. Řezníček

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno
Okresní veterinární zařízení, Vsetín

ČEPICA A., MENŠÍK J., POSPÍŠIL Z., ŘEZNÍČEK P. *Izolace a identifikace viru boviní virové diarrhoe – slizniční choroby (BVD-MD) v ČSR.* Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 569-581, 1975.

V práci je popsáno vzplanutí BVD-MD u telat a mladého skotu ve třech lokalitách v ČSR. Ze dvou akutně nemocných telat byl izolován cytopatogenní virus, který byl křížovým virusneutralizačním testem, přímou imunofluorescenční metodou a na základě stanovení druhu nukleové kyseliny a některých dalších vlastností identifikován jako virus BVD-MD blízce příbuzný kmeni NADL. Onemocnění se podařilo přenést intraperitoneální a intravenózní aplikací bezbakteriální suspenze sleziny a mízních uzlin mezenterálních z přirozeně infikovaného zvířete na tři zdravá, sérologicky negativní telata a prokázat tentýž virus v jejich orgánech, nosních sekretech a trusu v době od druhého do dvanáctého dne po infekci. V diskusi je pojednáno o účasti viru BVD-MD při vzniku průjmů a o jeho možném vlivu na průběh jiných infekčních onemocnění se zřetelem na epizootologickou situaci ve specializovaných velkochovech skotu.

telata; experimentální infekce; neutralizační test; imunofluorescence

Onemocnění původně popsané jako epizootická diarrhoea skotu s mnohočetnou patologickou manifestací je charakterizované průjmem, horečkou, leukopenií, nosním výtokem, depresí, nechutenstvím a dehydratací (Olafson aj., 1946). Při infekci březích vnímavých zvířat může virus BVD-MD proniknout do plodu (Gillespie aj., 1967) a způsobit abortus (Kahrs, 1968, Kahrs aj., 1970, 1971) nebo porod malformovaných (Ward, 1969, Bistner aj., 1970 a jiní) či málo životných telat (Lambert aj., 1974). K BVD-MD jsou vnímavé všechny věkové kategorie skotu a nákaza nemá sezónní charakter. Po prodělaném onemocnění zůstává imunita, v některých případech dochází však ke vzniku imunologické tolerance, která může mít za následek perzistentní viremii (Malmquist, 1968). Přirozenými hostiteli viru BVD-MD jsou kromě skotu také prasata (Fernelius aj., 1973a, b) a ovce (Hore aj., 1973). Byla zjištěna blízká antigenní příbuznost viru BVD-MD s virem moru prasat (Darbyshire, 1962) a virovým původcem tzv. „Border disease“ u ovcí (Hamilton a Timoney, 1972).

Virus BVD-MD se množí dobře na primárních buněčných kulturách (BK) telecích ledvin a varlat, přičemž cytopatický projev kolísá od nezřetelného až po výrazný. Slabě cytopatogenní nebo necytopatogenní

kmeny se dají prokázat testem homologní interference (Gillespie aj., 1962), END testem (Inaba aj., 1963) a metodou imunofluorescenční (Fernelius, 1964).

Bürki (1965) sledoval distribuci viru v organismu přirozeně infikovaného mladého skotu a zjistil, že největší množství viru je na sliznicích hlavy a střevního traktu, pak následuje střední a dolní respirační trakt a nejmenší množství obsahují játra, slezina a ledviny. Izolace viru z živých zvířat může být neúspěšnější z kultur promytých leukocytů často i v přítomnosti specifických sérových protilátek (Gutekunst a Malmquist, 1964).

Virus BVD-MD není zatím zařazen v klasifikačním systému do určité skupiny a nebyla stanovena symetrie jeho kapsidy. Je to RNK virus, přibližně 40 nm v průměru, citlivý k tukovým rozpouštědlům a trypsinu a není stabilizován v přítomnosti $MgCl_2$ (Dinter, 1963).

V této práci referujeme o enzootickém výskytu BVD-MD v jedné oblasti ČSR, doloženém izolací a identifikací viru, a o jeho pravděpodobném vlivu na vznik a průběh respiračního syndromu u telat v centrálním teletníku.

MATERIÁL A METODY

EPIZOOTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Na základě anamnézy jsme prošetřili případy onemocnění telat na dvou farmách JZD na okrese V. a v jednom centrálním teletníku ve Středočeském kraji. Po zevrubném klinickém vyšetření a odběru krve byla vybrána zvířata s typickými i málo výraznými klinickými příznaky a živá převezena na ústav k dalšímu vyšetření.

PITVA A ODBĚR VZORKŮ

Při pitvě byly k virologickému a histologickému vyšetření odebrány vzorky těchto orgánů: měkké patro, tvrdé patro, mandle, jícen, tenké střevo, tlusté střevo, slezina, játra, krev, mízní uzliny mezenterální. Vzorky pro virologické vyšetření byly buď hned zpracovány jako 10% suspenze orgánů v Earlově médiu bez séra a po ošetření antibiotiky použity k infekci buněčných kultur, nebo byly uloženy v uzavřených vzorkovnicích při teplotě $-70^{\circ}C$ až do vyšetření.

HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Vzorky k histologickému vyšetření byly fixovány v 10% formalínu a zality běžnou metodou do parafinu. Řezy silné 4–5 μm byly barveny hematoxylinem-eosinem.

POČÍTÁNÍ BÍLÝCH KRVINEK

K barvení leukocytů byl použit Türkův roztok a před počítáním v Bürkerově komůrce byla krev ředěna baničkovou metodou.

IZOLACE VIRU

K izolaci byly použity primární buněčné kultury fetálních bovinních ledvin (FBL) a varlat (FBVa), stabilní linie MDBK a linie derivované z fetální tracheální sliznice (FBTr) (Machatková a Pospíšil, 1975). Pro primární buněčné kultury bylo jako růstové médium použito Earlovo médium s přídavkem 0,5 % laktalbumin hydrolyzátu a 0,1 % kvasničného extraktu (Difco) a pro stabilní linie médium MEM

(ÚSOL Praha) s přidavkem 20 % telecího séra. Dobře narostlé stacionární buněčné kultury ve zkumavkách byly infikovány 10% suspenzemi orgánů v Earlově médiu s přidavkem antibiotik. Po 30minutové adsorpci suspenze na holý monolayer při 37 °C byly buněčné kultury doplněny odpovídajícím médiem bez séra a inkubovány při stejné teplotě 7 až 10 dní. Zkumavky s CPE byly při denním sledování zmrazovány a negativní buněčné kultury byly použity ke třem dalším slepým pasážím.

IMUNOFLUORESCENČNÍ VYŠETŘENÍ

Primární tkáňové kultury telecích ledvin a varlat byly druhý, třetí a čtvrtý den po infekci opláchnuty v čistém kultivačním médiu a po zaschnutí fixovány 5 minut ve vychlazeném acetonu. Virus byl prokazován přímou imunofluorescenční metodou s konjugátem vyrobeným v Biovetě Nitra, jednak vlastním konjugátem připraveným z hyperimunního séra podle metody Albrechta (1963).

PŘÍPRAVA ANTISÉR A VIRUSNEUTRALIZAČNÍ TEST

Antiséra proti nově izolovaným kmenům B-1 a B-2, proti kmenu NADL viru BVD-MD*), kmenu V-92 viru PI-3 a kmenu R-6 viru IBR byla vyrobena imunizací konvenčně odchovaných telat, u nichž před imunizací nebyly protilátky proti uvedeným virům prokázány. V první imunizační dávce obdržela telata 10 ml koncentrovaného viru intravenózně a stejnou dávku aa s Freundovým adjuvans intramuskulárně. Další imunizace stejnou dávkou byla provedena po 21 dnu a v intervalu jednoho týdne byla ještě dvakrát zopakována. Týden po poslední aplikaci byla telata vykrvena a získané sérum rozplněno a zmrazeno při -20 °C.

Virusneutralizační (VN) protilátky byly prokazovány metodou „konstantní virus — ředění sérum“ ve zkumavkovém 1 ml systému s infekcí směsí virus — sérum na čerstvě narostlý buněčný porost. Pro kmeny viru BVD-MD bylo použito primárních buněčných kultur FBL a FBVa a pro PI-3 a IBR stabilní linie FBTr. Dvojnásobná ředění sér byla smíchána se stejným objemem virové suspenze obsahující 100 TKID₅₀ (0,1 ml) a inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě. Titr VN protilátek byl stanoven jako nejvyšší ředění séra, které zabránilo rozvoji CPE v 50 % infikovaných buněčných kultur.

EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE

Tři konvenčně odchovaná tři měsíce stará, sérologicky negativní telata byla infikována bezbakteriálním filtrátem 10% suspenze sleziny a mizních uzlin mezenterálních akutně nemocného telete č. 42705 z lokality B v dávce 10 ml suspenze intravenózně a 10 ml intraperitoneálně.

Telátům byla dvakrát denně měřena tělesná teplota a po dobu 10 dní jim byla denně odebírána krev ke stanovení celkového počtu leukocytů. Tele č. 1 bylo utraceno 10. den, tele č. 2 12. den po infekci. Tele č. 3 bylo ponecháno naživu a vyšetřováno na přítomnost VN protilátek v krevním séru. Orgány usmrcených telat byly vyšetřeny na přítomnost viru.

TITRACE VIRU

Pro stanovení infekčního titru byla připravena desetinasobná ředění viru v Earlově médiu až do 10⁻⁶ a v množství 0,1 ml byla inokulována nejméně na tři zkumavky s primárními buněčnými kulturami. Infekční titr TKID₅₀ (0,1 ml) byl stanoven podle Reeda a Muencha (1938).

STANOVENÍ DRUHU NUKLEOVÉ KYSELINY

Pro stanovení druhu nukleové kyseliny izolovaného kmene byl použit 6-jodo-2-deoxyuridin (JDU) podle metody Pensaerta aj. (1970). JDU byl přidán do udržovacího média v koncentraci 100 µg ml⁻¹ 18 hodin před infekcí a po infekci

*) Cytopatický kmen BVD-MD NADL jsme získali laskavostí doc. A. Žuffy ze Střediska pro výzkum a vývoj při Biovetě, n. p., Nitra.

opět. Virus PI-3 byl použit pro kontrolu účinku JDU jako známý RNK virus, virus IBR jako DNK virus. Test byl proveden v 300ml Roux lahvích s objemem inokula 1,0 ml. Koncentrace inokula byla vždy 100 TKID₅₀ (0,1 ml). Pokus byl ukončen, jakmile se na kontrolních infikovaných lahvích bez JDU objevil CPE.

STANOVENÍ REZISTENCE K TUKOVÝM ROZPOUŠTĚDLŮM

Bylo posuzováno podle metodik, které popsali Andrewes a Horstman (1949) a Feldman a Wang (1961). K neředěné suspenzi viru bylo přidáno 20 % dietyléteru nebo 10 % chloroformu a směs byla za občasného protřepání ponechána 18 hodin při teplotě +4 °C. Po odpaření éteru nebo chloroformu byl stanoven infekční titr virové suspenze. Kontrolní vzorek obsahoval místo tukových rozpouštědel pufovaný fyziologický roztok o pH 7,2.

STANOVENÍ VELIKOSTI INFEKČNÍCH ČÁSTIC ULTRAFILTRACÍ

Vzorky viru uskladněné při -70 °C byly rozmrazeny, naředěny v pufovaném fyziologickém roztoku v poměru 1 : 10 a filtrovány přes miliporové filtry dovolující proniknout částicím menším než 50 nm.

HEMAGLUTINACE

Hemaglutinační aktivita izolovaného kmene byla zjišťována na plotnách tak, že 0,4 ml 0,5% suspenze třikrát promytých erytrocytů bylo přidáno ke stejnému množství dvojnásobných ředění viru v PBS. V testu byly použity hovězí, ovčí, kozí, prasečí, králíčí, morčecí, slepičí a myší červené krvinky. Reakce byla ponechána při +4 °C, +37 °C a při pokojové teplotě a byla odečtena za 1, 2 a 24 hodiny.

HEMADSORPCE

Memadsorpce byla provedena s 1% suspenzí erytrocytů všech uvedených živočišných druhů podle metodiky Vogela a Shelokova (1957).

VÝSLEDKY

EPIZOOTOLOGICKÁ SITUACE V POSTIŽENÝCH CHOVECH

Lokalita R, okres V. První případy onemocnění telat s akutním průběhem a letálním koncem byly pozorovány u telat nakoupených z malochovu a přivedených do teletníku JZD, kde bylo ustájeno asi 60 vlastních různě starých zdravých telat. Ze 17 nakoupených telat 15 telat uhynulo nebo bylo nutně poraženo. Poslední dvě telata byla zevrubně vyšetřena. Onemocnění mělo velmi typický průběh s charakteristickými lézemi na sliznici hlavy.

Telata měla horečku (40,5–41,5 °C). měla zvýšenou salivaci, výtok z nosu a očí a na sliznici pysků a horního patra byly patrné eroze. Krvavý průjem byl provázen tenesmem.

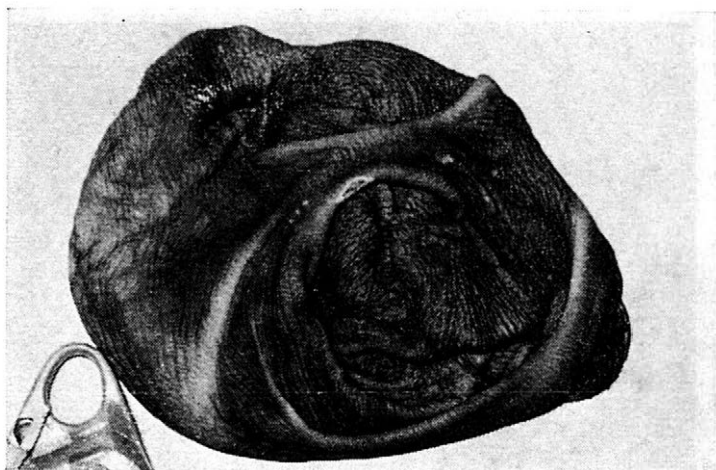
Lokalita B, okres V. Onemocnění probíhalo v akutní a subakutní formě u telat ve stáří dva až tři měsíce, ustájených společně s dojnícemi. Klinicky onemocnělo asi 10 % telat, přičemž většina akutně nemocných telat uhynula. Úhynům předcházely několikadenní horečky kolem 41 °C, nechutenství, slinotok, suchý kašel, sérozní výtok z nosu, těžké průjmy s příměsí krve, tenesmus a částečná dehydratace. Na sliz-



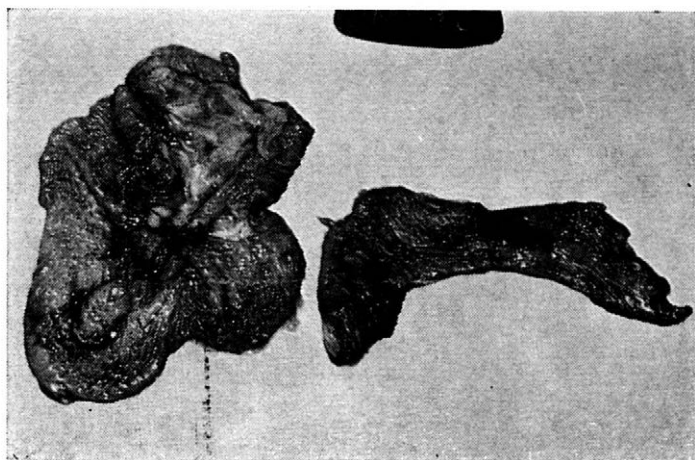
1. Slizniční eroze na dolním pysku nemocného telete



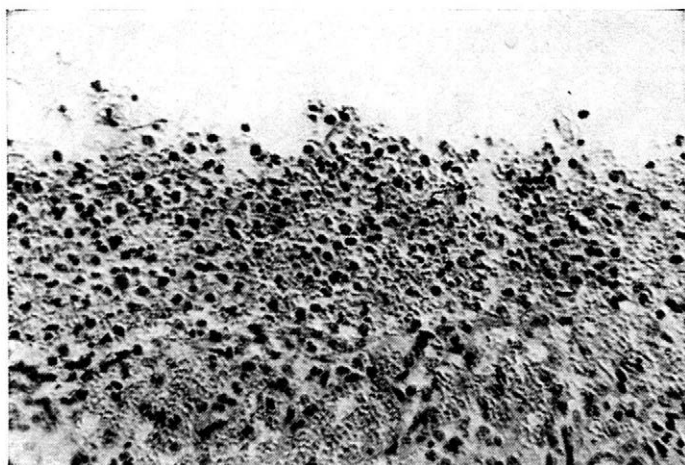
2. Početné eroze na rozhraní sliznice tvrdého a měkkého patra



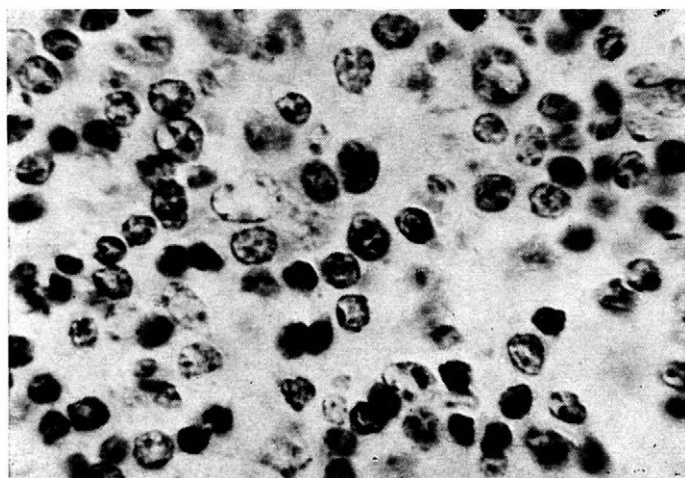
3. Eroze na bachorovém pilíři nemocného telete



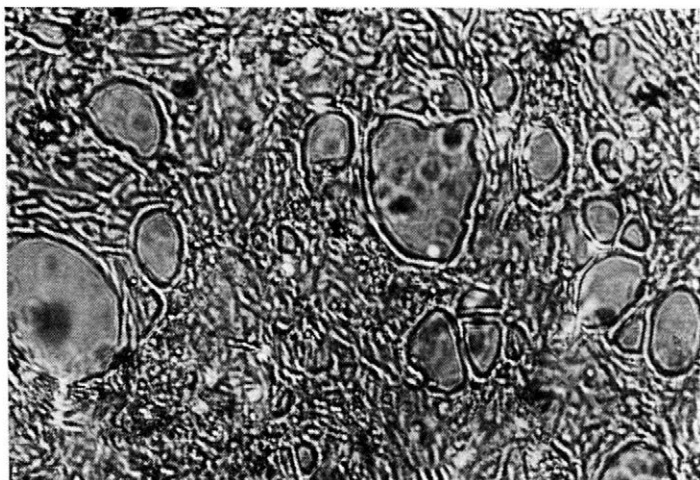
4. Hemoragické exoze (vpravo) a zvředovatělá sliznice s nekrotickými masami (vlevo) v tlustém střevě



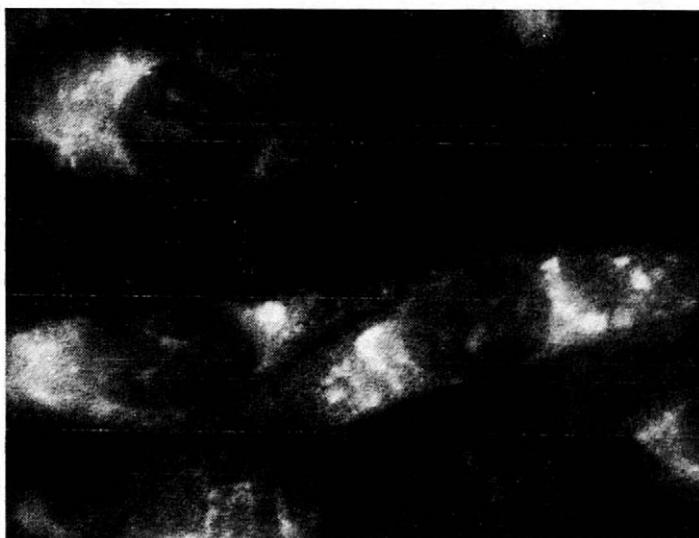
5. Výrazné hemoragie v submukóze střeva, nekróza a ztráta klků (barveno hematoxylin-eosinem; zvětšeno 120×)



6. Úbytek lymfocytů z mezenterální mízní uzliny (barveno hematoxylin-eosinem; zvětšeno 420×)



7. Cytopatický efekt kmene B-1 ve 20. pasáži na primární buněčné kultuře fetálních bovinních ledvin (72 hod. po infekci; nativní preparát; zvětšeno 110 X)



8. Specifická fluorescence izolovaného kmene B-1 na buněčné kultuře FBL za tři dny po experimentální infekci (zvětšeno 510 X)

nici dutiny ústní byly nalézány eroze charakterizované ztrátou povrchových vrstev epitelu, kterým nepředcházela tvorba vezikulů. Dvě akutně nemocná telata (č. 42705 a č. 110) byla převezena k vyšetření.

Lokalita T, okres K. V teletníku s kapacitou kolem 200 kusů vzplanula enzootie respiračního onemocnění. Příznaky poruch trávicího traktu nebyly pro BVD-MD typické; eroze v dutině ústní a průjmy s velkou příměsí krve byly zjištěny jen ojediněle. U nemocných telat byla však zjištěna výrazná leukopenie a ojediněle se objevilo přechodné kulhání. Celkové ztráty dosáhly více než 20 % z celkového stavu telat, které však byly přičítány bronchopneumoniím. Telatům různého věku byla odebrána krev k sérologickému vyšetření.

PATOMORFOLOGICKÝ NÁLEZ

Změny zjišťované při pitvě byly u jednotlivých telat značně rozdílné v závislosti na průběhu a stupni onemocnění. U akutní formy onemocnění byly pozorovány katarální záněty sliznic trávicího traktu s hyperemií a krváceninami. U protrahovaných případů byly nalézány ostře ohraničené eroze na sliznici dolního pysku (obr. 1), na tvrdém patře (obr. 2), na laterální a ventrální straně jazyka a na bukální sliznici. Na jícnu byly čárkovité eroze často pokryty nekrotickým epitelem, který vytvářel fibrinu podobné plaky, mírně vyvýšené nad úroveň epitelu. U některých telat změny v jícnu chyběly. Na pilířích bachorových (obr. 3), často i mimo ně, a na listech knihy byly pozorovány bělavé eroze, někdy s hemoragickým základem. Na katarálně změněné sliznici slezu byly větší či menší vředy. Změny ve střevech se nejčastěji vyskytovaly v kaudální části tenkého střeva, ve slepém střevě, kolonu a rektu. Stěna střevní byla ztlustělá, na sliznici byly pozorovány kulaté nebo podlouhlé hemoragické útvary (obr. 4), místy zvředovatělé a pokryté nekrotickými žlutavými masami nebo zajizvované (obr. 4). Také na sliznici rekta byly pozorovány četné hemoragie. V obsahu střev byla často příměs krve. Mezenteriální mizní uzliny byly zvětšené, hyperemické, někdy se v nich vyskytovaly hemoragie. U dvou telat jsme pozorovali četné krváceniny subserózně v dutině břišní, na sliznici spojivky a močového měchýře.

Základem histologických změn byly degenerativní a hlavně nekrotické změny epitelu sliznic. Ve střevě docházelo k nekrotizaci epitelu krypt a klků, v jejichž stromatu a v submukóze byly pozorovány výrazné hemoragie (obr. 5). V některých případech byla celá vrstva sliznice nad Peyerovými plakami nekrotická.

V mezenterálních mizních uzlinách a v Peyerových placích byla pozorována atrofie lymfatické tkáně, úbytek lymfocytů i lymfatických folikulů a degenerativní procesy (obr. 6).

VÝSLEDKY SÉROLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ V CHOVECH R. A T.

V lokatitě T. byly nalezeny protilátky proti viru BVD-MD u 90 % telat a signifikantní vzestup titru byl prokázán v rekonvalescentních sérech u 5 % vyšetřovaných telat. V chovu R. bylo 75 % telat sérologicky pozitivních k BVD-MD a u 10 % telat byl zjištěn průběžný vzestup titru VN protilátek v rekonvalescentních sérech.

Průběh izolačních pokusů ukazuje tab. I. Virus byl izolován od obou telat z lokality B. Tele č. 42705 bylo utráceno ve stadiu viremie a virus byl prokázán v krvi a ve všech ostatních vyšetřovaných orgánech kromě jater. K další práci byl použit virus izolovaný ze střeva, který byl označen jako kmen B-1. Z telete č. 110 se podařilo izolovat virus pouze ze sleziny (kmen B-2) a z mízních uzlin mezenterálních. První cytopatické změny byly zřetelné ve druhé pasáži na FBVa a ve třetí pasáži na FBL. Na FBVa byl cytopatický efekt výraznější, k úplné destrukci buněčného porostu došlo ve čtvrté až páté pasáži, kdežto na FBL až v pasáži osmé. Přibližně třetí až čtvrtý den po infekci se začaly objevovat kolonie buněk s vakuolizovanou a granulovanou cytoplazmou a silně pyknotickými jádry. Takto poškozené buňky se uvolňovaly do média a v buněčném porostu vznikala oka. V porostu bylo možno ojediněle pozorovat také zakulacující se buňky (obr. 7).

I. Izolace viru z telat č. 42705 a č. 110

Orgány	Buněčné kultury							
	FBL		FBVa		FBTr		MDBK	
	č. 42705	č. 110	č. 42705	č. 110	č. 42705	č. 110	č. 42705	č. 110
Měkké patro	+3.p	—	+2.p	—	—	—	—	—
Tvrdé patro	+3.p	—	+2.p	—	—	—	—	—
Tonzila	+4.p	—	+2.p	—	—	—	—	—
Jícen	+4.p	—	+2.p	—	—	—	—	—
Tenké střevo	+3.p	—	+2.p	—	—	—	—	—
Tlusté střevo	+3.p	—	+2.p	—	—	—	—	—
Slezina	+4.p	+4.p	+2.p	+2.p	—	—	—	—
Játra	—	—	—	—	—	—	—	—
Krev	+4.p	—	+4.p	—	—	—	—	—
Mízní uzliny mezenterální	+4.p	+3.p	+2.p	+2.p	—	—	—	—

Vysvětlivky: +3.p rozvoj CPE ve 3. pasáži
 FBL primární buněčná kultura fetálních bovinních ledvin
 FBVa primární buněčná kultura fetálních bovinních varlat
 FBTr stabilní buněčná linie fetální bovinní tracheální sliznice
 MDBK stabilní buněčná linie — negativní výsledek

IDENTIFIKACE IZOLOVANÝCH VIROVÝCH KMENŮ

Imunofluorescenčním vyšetřením byla první specifická fluorescence pozorována za 24 hodin po infekci ve formě jasně žlutozelených granul v perinukleární zóně (obr. 8). Intenzita fluorescence stoupala do třetího dne po infekci a od čtvrtého dne se difúzní intracytoplazmatická fluorescence stávala méně zřetelnou. Při srovnání výsledků imunofluorescenčního vyšetření mezi kmenem NADL a našim izolátem B-1 nebyl v charakteru fluorescence zjištěn rozdíl.

Oba izolované kmeny se ukázaly sérologicky identické s kmeny NADL (tab. II), obsahují RNK (tab. III), jsou étersenzitivní (tab. IV), průměr vironu je menší než 50 nm (tab. V) a neaglutinují ani neadsorbují žádný z testovaných druhů erytrocytů.

II. Sérologická identifikace izolovaných virových kmenů

Virus	Antiséra			
	izolát B-1	BVD-MD (NADL)	PI-3 (V-92)	IBR (R-6)
Izolát B-1	1024	1024	—	—
Izolát B-2	512	256	—	—
BVD-MD (NADL)	256	1024	—	—
PI-3 (V-92)	—	—	1024	—
IBR (R-6)	—	—	—	256

III. Vliv JDU na množení testovaných virových kmenů

Virus	Infekční titr ($\log_{10}$ TKID ₅₀ /0,1 ml)	
	JDU	kontrola
Izolát B-1	4,30	4,30
Izolát B-2	3,70	3,40
PI-3 (V-92)	6,74	7,00
IBR (R-6)	7,50	2,25

IV. Citlivost izolátů a kmene NADL k tukovým rozpouštědlům

Kmen	Infekční titr ($\log_{10}$ TKID ₅₀ /0,1 ml)			
	dietyléter 20%	kontrola	chloroform 10%	kontrola
Izolát B-1	1,10	4,33	0	4,33
Izolát B-2	0,33	3,14	0	3,14
BVD-MD (NADL)	1,00	4,30	0	4,30

V. Stanovení velikosti infekčních partikulí ultrafiltrací

Kmen	Infekční titr ($\log_{10}$ TKID ₅₀ /0,1 ml)		Rozdíl v titru
	před filtrací	po filtraci	
B-1	4,50	3,70	0,80
B-2	4,24	3,70	0,54
NADL	5,70	5,24	0,46

Ze tří experimentálně infikovaných telat onemocnělo pouze tele č. 3. Odpovědělo typickou bifázickou teplotní křivkou s menším vrcholem třetí den po infekci a s druhým výraznějším vrcholem osmý den po infekci. Leukopenie byla nejvýraznější čtvrtý den po infekci a již sedmý den po infekci se vrátil celkový počet leukocytů na fyziologickou hodnotu. Titr specifických VN protilátek dosáhl 14. den po infekci hodnoty 1:16 a 21. den 1:64. Nepodařilo se vyvolat ani průjem ani změny na sliznicích. Virus byl izolován z nosních výtěrů, rektálních výtěrů a krve telat č. 2 a 3 od 2. do 12. dne po infekci. Z telete č. 1, poraženého sedm dní po infekci, se reizolace viru nezdařila. Z telete č. 2, poraženého 12 dní po infekci, byl virus izolován ze suzpenzí nosní sliznice, sleziny, mízních uzlin mezenterálních a plic.

DISKUSE

I když je BVD-MD velmi rozšířené onemocnění a jeho původce se vyskytuje v chovech skotu ubikvitárně (Dinter, 1968), jsou znalosti o jeho patogenезe a imunologii ještě neúplné. Existují velmi rozdílné údaje o jeho morbiditě a mortalitě v průběhu nákazy. Po experimentální infekci vznikne zpravidla jen velmi mírné onemocnění, často bez zjevných klinických příznaků. Nabízí se vysvětlení, že k produkci kompletního syndromu BVD-MD u experimentálních zvířat je nezbytné vytvořit arteficiální stressovou situaci. Ve shodě s tímto předpokladem Bittle a House (1973) prokázali, že podání nepatogenního vakcinačního kmene BVD-MD telatům, ošetřeným imunosupresivně působícími kortikosteroidy, vedlo k vývoji kompletního syndromu slizniční choroby. Z těchto výsledků autoři soudí, že terénní případy vzplanutí slizniční choroby a nežádoucí postvakcinační onemocnění mohou souviset s neschopností některých jedinců tvořit protilátky proti viru. Na případy perzistentní viremie u BVD-MD bez tvorby VN protilátek u telat upozornil již Malmquist v roce 1968, avšak mechanismus jejího vzniku nebyl zatím dostatečně objasněn.

Charakteristickým nálezem při BVD-MD jsou výrazné změny v hematopoietickém systému nemocných zvířat zahrnující leukopenii, lymfoidní vyčerpanost a nekrózu lymfatické tkáně (Baker aj., 1954, Carlson aj., 1957, Olafson aj., 1946, Pritchard a Carlson, 1957 a Ramsey a Chivers, 1957). Za důležitý poznatek, jehož význam nebyl zatím zhodnocen v pokusech *in vivo*, může být považováno zjištění Diderholma a Dintera (1966), že infekce virem BVD-MD potlačuje tvorbu interferonu v buněčných kulturách. Na základě studií s infekcí leukocytárních kultur vyslovili Truitt a Shechmeister (1973) názor, že aktivní imunizace nezvyšuje celulární rezistenci proti viru BVD-MD.

Přesto, že znalost o účinku viru BVD-MD na lymfatický systém jsou dosud kusé, je zřejmé, že snížení specifické i nespecifické obrany organismu působením viru může sehrát významnou roli také v patogenезe ostatních infekcí.

V naší práci, v níž informujeme o první zdařilé izolaci viru BVD-MD v ČSR, jsme mohli sledovat rozdílný obraz nákazy v závislosti na podmínkách chovu.

Epizootologická situace v lokalitě R. může sloužit za školní příklad vzplanutí nákazy u vnímavých jedinců, kteří se poprvé setkali s virem, přičemž telata narozená na farmě neonemocněla. Nejpříjemnější vysvětlení pro vznik nákazy je existence latentního, ale infekčního viru v imunní populaci skotu a možnost infekce vnímavých jedinců cizího původu. Prudký průběh onemocnění a velmi vysoká morbidita i mortalita ve sledované lokalitě svědčí o značné vnímavosti nakoupených telat.

V další lokalitě (B) byl obraz nákazy zcela odlišný. Onemocnění probíhalo u různě starých telat různě. Mělo sklon k subklinickým a latentním formám a jen občas exacerbovalo a projevilo se zřetelnějšími klinickými příznaky. V centrálním teletniku v lokalitě T., kde jsme mohli potvrdit BVD-MD jen na základě sérologického vyšetření a kde na interkurentní infekci poukazovaly jen krátkodobé průjmy, byly těžké formy bronchopneumonii spojené s vysokými ztrátami pravděpodobně podmíněny nepřímým účinkem viru BVD-MD na celkovou obranyschopnost zvířat. Do jaké míry může i latentní a v chovu perzistující virus poškozovat lymfatický systém zejména u mláďat, nelze na základě současných informací ještě rozhodnout. Zdá se však, že při řešení závažných a komplikovaných nakažových problémů v nově formovaných a reorganizovaných chovech skotu budeme muset více pozornosti než dosud věnovat i těm virovým infekcím, které sice v mnoha případech vyvolávají jen lehké a mírné formy onemocnění, mohou však svým specifickým účinkem na lymfatický systém ovlivňovat vznik i průběh jiných infekčních chorob.

Zatímco o synergickém účinku virů, mykoplazmat a bakterií při vzniku respiračních onemocnění selat a telat existuje řada informací (Shope, 1931, Hetrick aj., 1963, Sinha a Abinanti, 1962 aj.), jsou údaje o současné infekci dvěma a více viry u telat jen ojedinělé (Hubbert aj., 1973). V experimentálních podmínkách se nám podařilo vyprovokovat klinické onemocnění IBR u latentně infikovaných zvířat po infekci virem PI-3 (Menšík aj., 1975).

Izolace cytopatogenního viru BVD-MD spolu s údaji o výskytu této nákazy v klinické formě (Vrtiak aj., 1974) a průkaz protilátek v chovech skotu na Slovensku (Žuffa aj., 1972) podtrhují význam při vzniku průjemových onemocnění telat a skotu v našich podmínkách. Do jaké míry ovlivňuje jeho existence v našich chovech vznik jiných, hlavně respiračních infekcí a jejich průběh, musí být předmětem dalšího studia.

Bez objasnění vzájemných vztahů jednotlivých obligátně i fakultativně patogenních zárodků a jejich komplexního působení na vnímavý i rezistentní organismus zvířat v různých podmínkách chovu budou možnosti účinné prevence a kontroly hospodářsky závažných infekčních chorob jen velmi omezené. Jen dílčí úspěchy lze také očekávat od takových opatření, která se zaměřují na kontrolu jen jednoho zárodku, i když z hlediska etiologie a patogeneze nesporně významného. Svědčí o tom stále živá diskuse o problematice respiračních infekcí skotu v USA (Bittle a York, 1968, House a Baker, 1968 a další) a ekonomické ztráty, které způsobují, přestože existuje řada účinných vakcín proti IBR, PI-3 a BVD-MD (Gale aj., 1963, King a Gale, 1963, McKecher, 1968, Bittle, 1968, Casselberry, 1968, Fernelius aj., 1971 a 1972).

Ekonomický význam BVD-MD v našich podmínkách můžeme jen těžko odhadnout. Zavedení rutinní sérologické diagnostiky do praxe by přineslo informace o frekvenci viru v populacích skotu a mohlo by objasnit některé nediagnostikované příčiny ztrát.

V případě širšího použití vakcín je třeba vzít v úvahu zjištění, že i atenuovaný, nepatogenní kmen může u stressovaných zvířat vyvolat onemocnění, a že ne všechna mladá zvířata jsou schopna tvořit protilátky (Bittle a House, 1973). V žádném případě nebude komplexní postup proti BVD-MD v našich specializovaných velkochovech jednoduchou záležitostí, zejména budeme-li nuceni při vakcinaci a revakcinaci, která se každoročně opakuje, kontrolovat u všech zvířat protilátkovou odpověď a vyřazovat z chovu kusy, které nejsou schopny tvořit protilátky, jak to doporučují Bittle a House (1973).

Literatura

- ALBRECHT, P.: Vizualizácia antigénov metódou fluorescentných protilátok. Praha 1963.
- ANDREWES, C. H. — HORSTMAN, D. M.: The susceptibility of viruses to ethyl ether. *J. gen. Microbiol.*, 1949, č. 3, s. 290-297.
- BAKER, J. A. — YORK, C. J. — GILLESPIE, J. H. — METCHEL, G. B.: Virus diarrhea in cattle. *Am. J. vet. Res.*, 15, 1954, s. 525-531.
- BITTLE, J. L.: Comments on infectious bovine rhinotracheitis immunization. *J. Am. vet. med. Ass.*, 152, 1968, s. 858-859.
- BITTLE, J. L. — HOUSE, J. A.: Comments on bovine viral diarrhea vaccine reactions. *J. Am. vet. med. Ass.*, 163, 1973, s. 878-879.
- BITTLE, J. L. — YORK, C. J.: Combination vaccines for control of bovine respiratory diseases. *J. Am. vet. med. Ass.*, 152, 1968, s. 889-893.
- BISTNER, S. I. — RUBIN, L. F. — SAUNDERS, L. Z.: The ocular lesions of bovine viral diarrhea-mucosal disease. *Pathologia vet.*, 1970, č. 7, s. 275-286.
- BÜRKI, F.: Bovine Virus-Diarrhöe. Quantitative Verteilung des Erregers und Isolierchancen. *Pathologia Microbiol.*, 28, 1965, s. 158-166.
- CARLSON, R. G. — PRITCHARD, W. R. — DOYLE, L. P.: The pathology of virus diarrhea of cattle in Indiana. *Am. J. vet. Res.*, 18, 1957, s. 560-568.
- CASSELBERRY, N. H.: Present status of immunization procedures for infectious bovine rhinotracheitis. *J. Am. vet. med. Ass.*, 152, 1968, s. 853-856.
- DARBYSHIRE, J. H.: Agar gel diffusion studies with a mucosal diseases of cattle. II. A serological relationship between a mucosal disease and swine fever. *Res. vet. Sci.*, 118, 1962, s. 125-127.
- DIDERHOLM, H. — DINTER, Z.: Interference between strains of bovine virus diarrhea virus and their capacity to suppress interference of a heterologous virus. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 121, 1966, s. 976-980.
- DINTER, Z.: Relationship between bovine virus, diarrhea virus and hog cholera virus. *Zentbl. Bakt. Parasitkde*, 187, 1963, s. 475-486.
- DINTER, Z.: Mucosal disease. *Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren*. Band III/2. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag 1968. 721 s.
- FELDMAN, H. A. — WANG, S. S.: Sensitivity of various viruses to chloroform. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 106, 1961, s. 736-738.
- FERNELIUS, A. L.: Noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses detected and titrated by immunofluorescence. *Can. J. comp. Med.*, 28, 1964, s. 121-126.
- FERNELIUS, A. L. — AMTOWER, W. C. — LAMBERT, G. — CLURKIN, A. W. Mc — MATTHEWS, P. J.: Bovine viral diarrhea virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine. *Can. J. comp. Med.*, 37, 1973, s. 13-20.

- FERNELIUS, A. L. — AMTOWER, W. C. — MALMQUIST, W. A. — LAMBERT, G. — MATTHEWS, P. J.: Bovine viral diarrhea in swine: neutralizing antibody in naturally and experimentally infected swine. *Can. J. comp. Med.*, 37, 1973, s. 96-102.
- FERNELIUS, A. L. — CLASSICK, L. G. — SMITH, R. L.: Evaluation of a soluble antigen vaccine prepared from bovine diarrhea-mucosal disease virus-infected cell cultures. *Am. J. vet. Res.*, 32, 1971, s. 1963-1971.
- FERNELIUS, A. L. — CLASSICK, L. G. — SMITH, R. L.: Evaluation of beta-propiolactone-inactivated- and chloroform-treated-virus vaccines against bovine diarrhea-mucosal disease. *Am. J. vet. Res.*, 33, 1972, s. 1421-1431.
- GALE, C. — HAMDY, A. H. — TRAPP, A. L.: Studies on an experimental vaccine for prophylaxis of shipping fever. *J. Am. vet. med. Ass.*, 142, 1963, s. 884-887.
- GILLESPIE, J. — BARTOLOMEW, R. — THOMSON, P. — ENTEE, K. Mc: Isolation of non-cytopathic virus diarrhea virus from two aborted bovine fetuses. *Cornell Vet.*, 57, 1967, s. 564-571.
- GILLESPIE, J. H. — MADIN, S. H. — DARBY, N. B.: Cellular resistance in tissue culture, induced by noncytopathogenic strains, to a cytopathogenic strain of virus diarrhea virus of cattle. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 110, s. 248-250.
- GUTENKUNST, D. E. — MALMQUIST, W. A.: Complement-fixing and neutralizing antibody response to bovine viral diarrhea and hog cholera antigens. *Can. J. comp. Med.*, 28, 1964, s. 19-23.
- HAMILTON, A. — TIMONEY, P. J.: B. V. D. virus and „Border disease“. *Vet. Rec.*, 91, 1972, s. 468.
- HETRICK, F. — CHANG, S. — BYRNE, R. — HANSEN, P.: The combined effect of *Pasteurella multocida* and *Myxovirus parainfluenza* 3 upon calves. *Am. J. vet. Res.*, 24, 1963, s. 939-947.
- HORE, D. E. — SMITH, H. V. — SNOWDON, W. A. — UREN, J.: An investigation of viral and bacterial agents associated with ovine perinatal mortality. *Aust. vet. J.*, 49, 1973, s. 190-195.
- HOUSE, J. A. — BAKER, J.: Comments on combination vaccines for bovine respiratory diseases. *J. Am. vet. Med. Ass.*, 152, 1968, s. 893-894.
- HUBBERT, W. T. — FERNELIUS, A. L. — MAATEN, M. J. van der — ESTES, P. C. — BRYNER, J. H.: Concurrent dual viral infection of a bovine foetus. *Vet. Rec.*, 93, 1973, s. 45-46.
- INABA, Y. — TSUNEYOSHI, O. — KUMAGAI, T.: Detection and measurement of noncytopathogenic strains of virus diarrhea of cattle by the END method. *Arch. ges. Virusforsch.*, 13, 1963, s. 425-429.
- KAHRS, R. F.: The relationship of bovine diarrhea-mucosal disease to abortion in cattle. *J. Am. vet. med. Ass.*, 153, 1968, s. 1652-1655.
- KAHRS, R. F. — SCOTT, F. W. — HILLMAN, R. B.: An appraisal of fetal serology for the diagnosis of bovine abortion and congenital defects. *Proc. U. S. Anim. Hlth Ass.*, 75, 1971, s. 588-594.
- KAHRS, R. F. — SCOTT, F. W. — LAHUNTA, A. de: Bovine viral diarrhea-mucosal disease, abortion and congenital cerebellar hypoplasia in a dairy herd. *J. Am. vet. med. Ass.*, 156, 1971, s. 851-857.
- KING, N. B. — GALE, C.: Studies on *Myxovirus parainfluenza* — 3 vaccine for prevention of shipping fever in cattle. *J. Am. vet. med. Ass.*, 142, 1963, s. 881-883.
- LAMBERT, G. — CLURKIN, A. W. Mc — FERNELIUS, A. L.: Bovine viral diarrhea in the neonatal calf. *J. Am. vet. med. Ass.*, 164, 1974, s. 287-289.
- MACHATKOVÁ, M. — POSPÍŠIL, Z.: Biologic characteristics of cell lines derived from the respiratory tract of a bovine foetus. *Folia biol.*, Praha, 1974, (in press).
- MALMQUIST, W. A.: Bovine viral diarrhea-mucosal disease: etiology, pathogenesis and applied immunity. *J. Am. vet. med. Ass.*, 152, 1968, s. 763-770.
- McKERCHER, D. G.: Comments on infectious bovine rhinotracheitis. *J. Am. vet. med. Ass.*, 152, 1968, s. 760-761.
- MENŠÍK, J. — POSPÍŠIL, Z. — SUCHÁNKOVÁ, A. — ČEPICA, A. — ROZKOŠNÝ, V. — ŠMÍD, B. — MACHATKOVÁ, M.: Využití komplexní virologické techniky k přímému průkazu virů PI-3 a IBR v orgánech infikovaných telat. *Vet. Med. (Praha)*, 20, 1975, č. 10-11, s. 609-622.

- OLAFSON, P. — CALLUM, A. D. Mc — FOX, F. H.: An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, 36, 1946, s. 205-213.
- PENSAERT, M. B. — BURNSTEIN, T. — HAEALTERMAN, E. O.: Cell culture adapted SH strain of transmissible gastroenteritis virus of pigs: *in vivo* and *in vitro* studies. *Am. J. vet. Res.*, 31, 1970, s. 771-781.
- PRITCHARD, W. R. — CARLSON, R. G.: Virus diarrhea in cattle. *J. Am. vet. med. Ass.*, 130, 1957, s. 383-385.
- RAMSEY, F. K. — CHIVERS, W. H.: Pathology of a mucosal disease of cattle. *J. Am. vet. med. Ass.*, 130, 1957, s. 381-383.
- REED, L. J. — MUENCH, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27, 1938, s. 493-497.
- SHOPE, R. E.: Swine influenza. I. Experimental transmission and pathology. *J. exp. Med.*, 54, 1931, s. 349-359.
- SINHA, S. K. — ABINANTI, F. R.: Shipping fever of cattle. *Adv. vet. Sci.*, 7, 1962, s. 225-271.
- TRUITT, R. L. SHECHMEISTER, I. L.: The replication of bovine viral diarrhea mucosal disease virus in bovine leucocyte *in vitro*. *Arch. ges. Virusforsch.*, 42, 1973, s. 78-87.
- VOGEL, J. — SHELOKOV, A.: Adsorption-hemagglutination test for influenza virus in monkey kidney tissue culture. *Science*, 126, 1957, s. 358-359.
- VRTIAK, O. J. — BAJOVÁ, V. — POPLUHÁR, L. — GDOVINOVA, A. — VASIL, M. — BORKO, J.: Výskyt slizničné choroby na východnom Slovensku. *Veterinárstvá*, 1974, č. 11, s. 485-487.
- WARD, G. M.: Bovine cerebellar hypoplasia apparently caused by BVD-MD virus. A case report. *Cornell Vet.*, 59, 1969, s. 570-576.
- ŽUFFA, A. — SALAJ, J. — DUŠEK, I. — ČERNÍK, K.: Výskyt protilátok proti vírusom infekčnej bovinnej rhinotracheitidy (IBR), parainfluenzy (PI-3) a slizničné choroby (VDV) v chovoch mladého dobytku v oblasti juhozápadného Slovenska. *Vet. Med. (Praha)*, 17, 1972, č. 6, s. 309-320.

Došlo dne 12. 6. 1975

ЧЕПИЦА А., МЕНЬШИК Я., ПОСПИШИЛ З., РЖЕЗНИЧЕК П. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Районный ветпункт, Всетин, Чехословакия). *Изоляция и идентификация вируса бычьего вирусного поноса (BVD-MD) в ЧСР*. *Vet. Med. (Praha)* 20 (10-11) : 569-581, 1975.

В статье описывается вспышка BVD-MD у телят и молодняка крупного рогатого скота в трех местах ЧСР. У двух острозаразных телят изолировался цитопатогенный вирус, который при помощи перекрестного вирус-нейтрализационного теста, непосредственного иммунофлуоресцентного метода и на основе определения вида нуклеиновой кислоты и некоторых других свойств был идентифицирован как вирус BVD-MD, близкородственный штамму NADL. Заболевание удалось перенести интраперитонеальным и интравенозным применением безбактериальной суспензии селезенки и мезентериальных лимфатических желез с естественно зараженного животного на три здоровых, серологически отрицательных животных и доказать тот же вирус в органах, выделениях носа и помета в период со второго до 12 дня после заражения. В дискуссии обсуждается участие вируса BVD-MD при появлении поносов и об его возможном влиянии на ход других инфекционных заболеваний с учетом эпизоотологического положения в специализированных крупных разведениях крупного рогатого скота.

телята; экспериментальная инфекция; нейтрализационный тест; иммунофлуоресценция

ČEPIČA A., MENŠÍK J., POSPÍŠIL Z., ŘEZNÍČEK P. (Veterinary Research Institute, Brno, District Veterinary Station, Vsetín, Czechoslovakia). *The Isolation and Identification of the Virus of Bovine Virus Diarrhoea-Mucosal Disease (BVD-MD) in the Czech Socialist Republic*. *Vet. Med. (Praha)* 20 (10-11) : 569-581, 1975.

The paper describes an outbreak of BVD-MD in calves and young cattle at three sites in the Czech Socialist Republic. Two acutely diseased calves were chosen for the isolation of the cytopathogenic virus which was identified as the BVD-MD virus

closely related to the NADL strain; the identification was based on the use of the cross virus-neutralizing test, the direct immunofluorescence method, and the determination of the kind of nucleic acid and some other characteristics. The disease was transferred by the intraperitoneal and intravenous application of the bacterium-free spleen and mesenterial lymph node suspensions from a naturally infected animal to three healthy calves with a negative serological response. The same virus was, then, detected in the organs, nasal secretions, and excrements of the artificially infected animals within the period from the second to the twentieth day of infection. The discussion deals with the participation of the BVD-MD virus in the origin of diarrhoeas and with its possible influence on the course of other infectious diseases, with respect to the epizootological situation in specialized large cattle herds.

calves; experimental infection; neutralization test; immunofluorescence

ČEPICA A., MENŠÍK J., POSPÍŠIL Z., ŘEZNÍČEK P. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno; Kreisveterinäreinrichtung, Vsetín, Tschechoslowakei). *Isolierung und Identifizierung des Virus der bovinen Virus-Diarrhoeis-Schleimhautkrankheit (BVD-MD) in der CSR*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11): 569-581, 1975.

In der vorliegenden Arbeit wird das Auftreten der BVD-MD-Krankheit bei Kälbern und Jungvieh in drei Lokalitäten in der CSR beschrieben. Bei zwei akut erkrankten Kälbern wurde ein zytopathogenes Virus isoliert, das mit Hilfe des Virusneutralisations-Kreuztestes, der direkten Immunofluoreszenzmethode und auf Grund der Bestimmung der Nukleinsäurenart und anderer weiterer Eigenschaften wie das dem NADL-Stamm naheverwandte BVD-MD-Virus identifiziert wurde. Durch intraperitoneale und intravenöse Applikation einer bakterienfreien Suspension der Milz und der mesenterialen Lymphknoten von natürlich infizierten Tieren gelang es die Krankheit auf drei gesunde, serologisch negative Kälber zu übertragen und dasselbe Virus in deren Organen, Nasensekreten und im Kot in der Zeit vom zweiten bis zwölften Tag nach der Infektion nachzuweisen. In der Diskussion wird der Anteil des BVD-MD-Virus am Entstehen von Durchfällen sowie der mögliche Einfluß dieses Virus auf den Verlauf anderer Krankheiten mit Rücksicht auf die epizootologische Situation in spezialisierten Rindergroßhaltungen erläutert.

Kälber; experimentelle Infektion; Neutralisationstest; Immunofluoreszenz

Adresa autorů:

MVDr. A. Čepica, doc. MVDr. J. Menšík, CSc., MVDr. Z. Pospíšil, CSc.,
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno - Medlánky
MVDr. P. Řezníček, Okresní veterinární zařízení, 755 01 Vsetín

Upozorňujeme čtenáře, že číslo 12 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

je věnováno otázkám radiobiologie a budou v něm uveřejněny následující články:

- J. Hrušovský: Vliv radiomimetik na imunoelektroforetické sledování krevního séra psů
- J. Prokeš, S. Šromová, K. Vulterin, O. Stavovčíková, M. Prokšová: Vliv X záření na metabolismus erytrocytů krys
- F. Lehký, E. Dobšínská: Terapie časných příznaků nemoci z ozáření u psů Pyrimetinem
- B. Zícha, P. Otoupal, V. Švantnerová, J. Janeček, V. Kalousová: Biochemický indikátor postiradiačního poškození u skotu
- J. Janeček, B. Zícha, P. Otoupal, V. Kalousová, V. Švantnerová: Dynamika časných změn v bílé složce periferní krve celotělově ozářeného skotu
- P. Otoupal, A. Gajdošík, B. Zícha: Klinické změny u celotělově ozářeného skotu
- P. Otoupal, A. Gajdošík, B. Zícha: Patomorfologické nálezy u ozářeného skotu
- J. Prokeš, S. Šromová, K. Vulterin, M. Prokšová, G. Graham: Vliv Cyklofosfamidu na metabolismus erytrocytů

ÚČAST MYKOPLAZMAT NA RESPIRAČNÍCH ONEMOCNĚNÍCH TELAT VE VELKOKAPACITNÍCH TELETNÍCÍCH V ČSSR

K. Jurmanová, M. Hájková, J. Krejčí, J. Černá

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

JURMANOVÁ K., HÁJKOVÁ M., KREJČÍ J., ČERNÁ J. Účast mykoplazmat na respiračních onemocněních telat ve velkokapacitních teletnících v ČSSR. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 583-593, 1975.

Klinicky, kultivačně a sérologicky jsme vyšetřovali přibližně 1000 telat v pěti skupinách v různých ročních obdobích. Před příchodem do teletníku byla telata zdravá a pouze z 20 % jejich nosních výtěrů jsme izolovali mykoplazmata. Tatáž telata po třech týdnech pobytu v teletníku prodělávala respirační onemocnění. Izolace mykoplazmat z nosních výtěrů telat v této době byla pozitivní v 70 až 95 % případů. Výsledky sérologických vyšetření byly v souladu s klinickými a kultivačními nálezy. Telata před příchodem do teletníku byla v 54 až 100 % bez protilátek proti sledovaným druhům mykoplazmat, zatímco po jednom až třech měsících pobytu v teletníku obsah protilátek signifikantně stoupl. V práci je popsána jednak metoda identifikace kolonií mykoplazmat technikou epi-imunofluorescence, jednak následující sérologické testy: inhibice hemaglutinace, latexová aglutinace, nepřímá hemaglutinace a vazba komplementu.

kultivace; epi-imunofluorescence; sérologické testy

Tlumení a prevence respiračních infekcí telat a mladého skotu je ztíženo složitou etiologií tohoto syndromu. Na vzniku hromadných onemocnění horních i dolních cest dýchacích se podílejí rozličné druhy mikroorganismů, mezi nimi i mykoplazmata a četné nepříznivé vlivy, které svými stresovými účinky oslabují přirozenou rezistenci zvířat a vytvářejí ekologické podmínky umožňující zvýšit patogenitu zúčastněných zárodků (I d e, 1970).

Přítomnost mykoplazmat u telat odchovávaných ve velkokapacitních zařízeních v ČSSR jsme sledovali od roku 1966 a zjistili jsme v horních cestách dýchacích i v plicích nemocných zvířat hojný výskyt hemadsorbujících kmenů *Mycoplasma bovirhinis* (M e n š í k aj., 1970, J u r m a n o v á a M e n š í k, 1971) a kmenů *M. arginini* (J u r m a n o v á a K r e j č í, 1971).

V této práci popisujeme klinicko-patologická, kultivační a sérologická vyšetření pěti skupin telat v různých ročních obdobích před a po převedení do teletníku. Sledujeme zdroje infekce telat mykoplazmaty, výskyt dalších druhů bovinních mykoplazmat v našich podmínkách a možnosti využití většího množství sérologických metod pro stanovení sérových protilátek.

MATERIAL A METODY

Telata byla sestavena po 100 až 270 kusech do skupin označených podle ročního období, ve kterém bylo zahájeno sledování. Zdravotní stav telat byl sledován běžnými klinickými metodami. Ke kultivačnímu vyšetření byl odebrán první vzorek na farmě z jedno- až dvoutýdenních telat a další po třech týdnech pobytu telat v teletníku s kontinuálním zástavem. Pro sérologické vyšetření byly odebrány vzorky krve při příchodu telat do teletníku, přibližně po jednom měsíci pobytu v teletníku a dále po třech až čtyřech a pěti až šesti měsících pobytu telat v teletníku. Skupiny, které se podařilo sledovat sérologicky po celou dobu šesti měsíců, měly asi 50 telat.

V průběhu vyšetřování v teletníku uhynulo nebo bylo nutně odporazeno 75 telat s pneumonií, jejich plíce byly kultivačně vyšetřeny.

ODBĚR VZORKŮ PRO KULTIVAČNÍ VYŠETŘENÍ

Výtěry z nosu byly odebrány sterilními vatovými tampony, které byly ponořeny do lahvičky s 1–2 ml tekuté kultivační půdy, dřívko odlomeno a lahvička uzavřena gumovou zátkou. Část nosních výtěrů byla ihned po odběru natřena přímo tamponem na pevnou půdu a kultivována ve vlhku při teplotě 37 °C. Z pneumonických plic byly odebrány vzorky z rozhraní normální a změněné plicní tkáně a uloženy do suchých lahviček. Vzorky nosních výtěrů a plicní tkáně v dobře uzavřených lahvičkách byly ihned po odběru zmrazeny v prostředí pevného CO₂.

IZOLACE A IDENTIFIKACE MYKOPLAZMAT

Suspenze z nosních výtěrů a plicních tkání byly v desetinásobném ředění inokulovány do tekutých půd a nakápnuty na pevné půdy. Tekuté kultivační medium se skládalo ze 70 ml infúze z telecích srdcí s 1 % Bacto-Peptonu a 0,5 % chlořidu sodného, 20 ml koňského inaktivovaného séra, 10 ml 25% extraktu z čerstvých kvasnic, 0,8 ml 10% octanu tálého a 20 000 m. j. penicilinu G. Pro přípravu pevné půdy byly použity tytéž komponenty, byl však přidán 1 g Special Agar Noble Difco, který byl předem rozvařen v infúzi z telecích srdcí. Výsledné pH půd bylo upraveno na 7,2.

Typické kolonie mykoplasmat, vyrostlé na pevné půdě ať po přímém očkování nebo po jedné pasáži v tekutých půdách, byly buďto použity ke klonování a založení kmenů později identifikovaných biochemicky a sérologicky postupy podrobně popsanými v Laboratorních vyšetřovacích metodikách II, ÚSVU Praha 1972, strana 232–238, anebo identifikovány metodou epi-imunofluorescence.

TEST EPI-IMUNOFLUORESCENCE (Freundt, 1973)

Z pevných půd s dobře vyvinutými koloniemi byly vyříznuty bločky různých tvarů pro odlišení antisér jednotlivých druhů, proti kterým byl izolát vyšetřován. Bločky se umístily na podložní sklo koloniemi vzhůru a jemnou Pasteurovou pipetou se na kolonie nanasly kapky specifických králíčních antisér, ředěných od 1:20 až 1:1600. Do protokolu byl zaznamenán tvar bločku ošetřeného příslušným antisérem. Po 30 minutách inkubace ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě se bločky promyly dvakrát po 10 minutách fyziologickým roztokem o pH 7,2, a to v zažátkovaných zkumavkách při stálém jemném třepání. Po přenesení bločku na podložní sklo se na kolonie nakapal antikráličí konjugát, který se po 15 minutách inkubace ve vlhku promyl stejným způsobem. Reakce byla posouzena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Jako kontroly sloužily bločky s koloniemi známých druhů ošetřených příslušným antisérem a bločky ošetřené pouze konjugátem bez antiséra. Během celého testu byla nutná mikroskopická kontrola správného umístění bločku na skle koloniemi vzhůru.

STANOVENÍ OBSAHU PROTILÁTEK V SÉRECH TELAT

Byly použity čtyři sérologické testy, používané v bakteriologické i virologické praxi, které byly modifikovány pro mykoplazmové antigeny. Latexová aglutinace byla provedena ve zkumavkách, ostatní tři testy v mikrosystému na plotnách. Séra před vyšetřením byla inaktivována.

Příprava antigenů. Kmeny mykoplasmat byly kultivovány v tekuté půdě a v pozdní logaritmické fázi růstu odstředěny. Sediment byl třikrát proprán fyziologickým roztokem a resuspendován ve vhodném ředidle v takovém poměru, aby výsledný objem byl proti původnímu objemu 100násobně menší. Pracovní ředění antigenů bylo stanoveno boxovou titrací se známým pozitivním sérem.

Latexová aglutinace (Morton, 1966). Sediment antigenu byl resuspendován v glycinovém pufru. Pracovní ředění antigenu bylo smícháno s latexem zředěným v poměru 1:5 destilovanou vodou tak, že k 1 ml antigenu bylo přidáno 0,4 ml naředěného latexu a směs ponechána 10 minut při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno 8,6 ml glycinového pufru s negativním králičím sérem v konečné koncentraci 0,1 % a směs opět ponechána při laboratorní teplotě 10 minut. Upravený glycinový pufr byl používán i k dvojnásobnému ředění vyšetřovaných sér ve zkumavkách v objemu 0,2 ml. Po přidání stejného objemu antigenu s latexem byla směs protřepána a inkubována 1 hodinu ve vodní lázni při teplotě 42 °C. Výsledek reakce byl posouzen po desetiminutovém odstředění zkumavek při 2000 obrátkách za minutu. Při pozitivní reakci se po zatřepání zkumavkou objevily vločky aglutinátu v čirém supernatantu, kdežto při negativní reakci se sediment změnil v obláček latexových částic. Glycinový pufr i latex byly dodány Imunou, n. p., Šarišské Michalany.

Inhibice hemaglutinace. Sediment antigenu byl resuspendován ve fyziologickém roztoku o pH 7,2 a po přidání fenolu v takovém množství, aby výsledná koncentrace bylo 0,5 %, inkubován čtyři dny při teplotě 37 °C. Vyšetřovaná séra byla dvojnásobně naředěna ve fyziologickém roztoku o pH 7,2 v množství 0,025 ml mikrotitrátorem a smíchána se stejným množstvím antigenu. Po 20 minutách inkubace při laboratorní teplotě bylo ke směsi přidáno 0,05 ml 0,75 % propraných ovčích erytrocytů. Po jedné hodině inkubace při laboratorní teplotě byla odečtena reakce; za pozitivní se pokládala sedimentace erytrocytů do ostře ohraničeného terčíku.

Nepřímá hemaglutinace (Dowle a Robinson, 1964). Sediment antigenu byl resuspendován ve fyziologickém roztoku o pH 7,2 a dezintegrován ultrazvukem. Inaktivovaná séra byla smíchána se stejným objemem neředěné suspenze třikrát praných ovčích erytrocytů a ponechána přes noc při teplotě +4 °C pro vysycení nespecifických aglutininů. 40 % suspenze třikrát propraných ovčích erytrocytů ve fyziologickém roztoku o pH 7,2 byla smíchána se stejným objemem kyseliny taninové, zředěné 1:20 000. Po 15 minutách působení při teplotě 37 °C s občasným protřepáním byly taninované erytrocyty třikrát promyty ve fyziologickém roztoku o pH 7,2, ze sedimentu připravena 20 % suspenze ve fyziologickém roztoku o pH 6,4 a smíchána se stejným objemem optimálního ředění antigenu. Po 15 minutách působení za občasného třepání byla směs odstředěna, krvinky s navázaným antigenem promyty ve fyziologickém roztoku o pH 7,2 s přídavkem 1 % králičího séra, který byl používán dále jako ředidlo pro celý test. K vysyceným, dvojnásobně naředěným sérum v mikrotitrátoru bylo přidáno stejné množství 10 % suspenze erytrocytů s navázaným antigenem. Směs byla protřepána a ponechána při laboratorní teplotě 1 hodinu. Za pozitivní reakci byla považována 75 až 100 % aglutinace erytrocytů. Pro kontrolu nespecifických reakcí bylo k sérum přidáno stejné množství taninovaných erytrocytů bez antigenu.

Vazba komplementu (Nicolet a deMeurone, 1970, Boulanger, 1968). Antigen byl připraven stejně jako pro inhibici hemaglutinace. Jako ředidlo pro test byl používán hypertonický roztok, který byl připraven zředěním v poměru 1:19 tohoto základního roztoku: NaCl 170 g, MgSO₄ · 7 H₂O 2 g, 40 % roztok CaCl₂ · 2 H₂O 1 ml, destilovaná voda ad 1000 ml, pH upraveno na 6,8. K sérum ředěným dvojnásobně v mikrotitrátoru byl přidán dvoujednotkový antigen a 1/2 jednotkový komplement, doplněný pěti procenty nativního negativního fetálního bovinního séra. Směs byla ponechána přes noc při teplotě 4 °C. Po přidání hemolytického systému, skládajícího se ze stejných dílů 20 % beraních krvinek a dvoujednotkového králičího amboceptoru proti beraním krvinkám, byla směs uložena na 30 minut do termostatu při teplotě 37 °C. Útlum hemolýzy ze 75 až 100 % byl považován za pozitivní reakci.

VÝSLEDKY

KLINICKO-PATOLOGICKÉ NÁLEZY

Sledovali jsme přibližně 1000 telat rozdělených do pěti skupin označených podle ročního období, ve kterém se započalo s vyšetřováním. Při prvním vyšetření jedno- až dvoutýdenních telat přímo na farmách byla telata bez klinických příznaků jakéhokoliv onemocnění. Po převedení telat do teletníku s kontinuálním zástavem se u všech pěti skupin telat projevily během dvou až čtyř týdnů pobytu klinické příznaky respiračního onemocnění charakterizované mukopurulentním výtokem z nozder, vlhkým kašlem, teplotami v rozmezí 39,5 až 41,0 °C a znaky polypnoe. Postmortálně byl na plicích nutně odporažených nebo uhynulých zvířat zjišťován ložiskový zánět apikálních a kardiálních laloků s pokročilou hepatizací plicní tkáně. Tímto onemocněním bylo postiženo asi 80 % telat v teletníku ve všech sledovaných ročních obdobích.

IZOLACE MYKOPLAZMAT

I. Procenta pozitivních izolací z nosních výtěrů telat na farmách (zdravých) a po převedení do teletníku (nemocných)

Období	Celkem		Procento izolací jednotlivých druhů					
			<i>M. bovirhinis</i>		<i>M. arginini</i>		<i>M. sp.</i>	
	FA	TE	FA	TE	FA	TE	FA	TE
Jaro	18	71	15	44	0	15	3	7*)
Léto	22	79	15	55	0	17	7	7
Podzim	22	95	18	55	2	19	2	21
Zima	20	73	18	34	0	35	2	4
Jaro II	20	74	6	14	10	46	4	14

Legenda:

M. sp. = zahrnuje druhy *A. laidlawii*, *M. bovirhinis*, *A. modicum* a neurčené druhy

FA = jeden až dvoutýdenní telata, vyšetřovaná na farmě

TE = telata po třech týdnech pobytu v teletníku

*) = výsledky uvedeny v procentech, jednotlivé skupiny obsahovaly 100 až 270 telat

Z nosních výtěrů zdravých telat na farmách byly izolace pozitivní v 18 až 22 % případů (tab. I). Počet pozitivních kultivačních nálezů stoupl u nemocných telat v teletníku na 71 až 95 %. Četnost výskytu jednotlivých druhů mykoplazmat v nosních výtěrech jak na farmách, tak v teletníku se během sledovaného období 15 měsíců měnila, nebyla však závislá na ročním období. Ve čtyřech obdobích převažoval výrazně druh *M. bovirhinis* jak u zdravých telat na farmách, tak u nemocných v teletníku. V posledním jarním období převažoval *M. arginini* nad *M. bovirhinis* u zdravých i nemocných telat. Skupina druhů, označená *M. sp.*, pod kterou jsme shrnuli identifikované druhy *M. bovirhinis*, *Acholeplasma laidlawii*, *A. modicum* a neurčené izoláty, zůstala po celou dobu v nos-

II. Izolace mykoplazmat z nosních výtěrů nemocných telat přímým nátěrem na pevné půdy a identifikace epi-imunofluorescencí

Počet telat	Celkem		Počet izolací jednotlivých druhů			
	pozitivní	negativní	<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. arginini</i>	<i>M. bovis-genitalium</i>	<i>A. modicum</i>
57	51	6	25	22	3	8

Poznámka: V 11 případech bylo identifikováno více druhů z jednoho výtěru

III. Izolace mykoplazmat z pneumonických plic telat

Počet plic	Celkem		Počet izolací jednotlivých druhů		
	pozitivní	negativní	<i>M. arginini</i>	<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. sp.**)</i>
75	53*)	22	30	13	13

*) Ve třech případech bylo izolováno *M. bovirhinis* společně s *M. arginini*

*) *M. sp.* zahrnuje druhy *A. laidlawii*, *M. bovis-genitalium*, *A. modicum* a neurčené izoláty

IV. Protilátky proti *M. bovirhinis*, stanovené čtyřmi sérologickými testy u tří skupin telat

Doba pobytu v teletníku		0			1 měsíc			3–4 měsíce			5–6 měsíců+		
Sérologická reakce/období		O	S	V	O	S	V	O	S	V	O	S	V
LA	P+	82	18	0	11	50	39	0	37	63++	—	—	—
	Z	80	20	0	8	57	35	0	37	63	0	19	81
	J II	23	77	0	0	46	54	0	18	82	0	22	78
IH	P	94	6	0	55	39	6	6	88	6	—	—	—
	Z	31	69	0	10	70	20	0	74	26	25	60	15
	J II	100	0	0	72	28	0	13	80	7	0	94	6
NH	P	73	27	0	11	67	22	0	61	39	—	—	—
	Z	73	27	0	21	71	8	0	48	52	2	36	62
	J II	87	11	2	41	52	7	2	55	43	6	35	59
VK	P	54	46	0	0	88	12	11	80	9	—	—	—
	Z	80	20	0	3	59	38	20	80	0	60	36	4
	J II	69	31	0	10	90	0	15	85	0	53	47	0

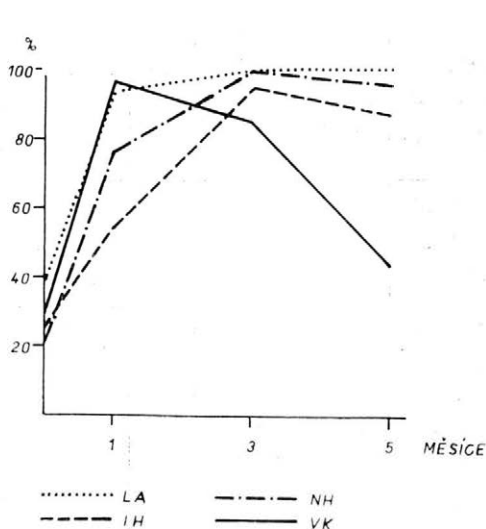
ních výtěrech zdravých i nemocných telat reprezentována nejmenším počtem izolátů.

Při srovnání výsledků izolačního postupu přímým nátěrem nosních výtěrů na pevné půdy s výsledky kultivací v tekutých půdách jsme zjistili, že záchytnost mykoplazmat ze silně infikovaných telat je přímým očkováním na pevné půdy dostatečná. Vyšetřili jsme tak 57 telat z teletníku, postižených těžkým respiračním onemocněním, z nichž bylo 51 pozitivní (tab. II). Kolonie vyrostlé na pevných půdách jsme identifikovali epi-imunofluorescencí a našli jsme 25 kmenů *M. bovirhinis*, 22 kmeny *M. arginini* a dalších 11 kmenů bovinních mykoplazmat. Technika přímého nátěru s následnou identifikací epi-imunofluorescencí umožnila zjistit v nosních výtěrech výskyt několika druhů mykoplazmat současně.

Kultivačním vyšetřením 75 plíc uhynulých nebo nutně odporažených telat s pneumoniemi jsme našli tyto druhy mykoplazmat (tab. III): *M. arginini* ve 30 případech, *M. bovirhinis* ve 13 případech a 13 kmenů bylo zahrnuto pod společný název *M. sp.*, zahrnující *M. bovigentalium*, *A. laidlawii*, *A. modicum* a neurčené izoláty. Ve třech případech byl izolován *M. bovirhinis* společně s *M. arginini*.

NÁLEZY PROTILÁTEK V SÉRECH TELAT

U podzimní, zimní a jarní II. skupiny telat jsme sledovali vzestup sérových protilátek proti *M. bovirhinis* a *M. arginini*. Proti *M. bovirhinis* jsme vyšetřovali metodou latexové aglutinace, inhibice hemaglutinace, nepřímé hemaglutinace a vazby komplementu skupiny telat o průměrném počtu 50 kusů v době příchodu do teletníku, a dále po jednom, třech a pěti měsících pobytu (tab. IV). V době příchodu nebyly žádnou z po-



1. Dynamika protilátek u telat detekovaných čtyřmi sérologickými metodami v průběhu pěti měsíců

LA — latexová aglutinace
IH — inhibice hemaglutinace
NH — nepřímá hemaglutinace
VK — vazba komplementu
% — procento telat

užitých sérologických metod stanoveny vysoké titry protilátek a procento telat s nulovými titry se až na dvě výjimky pohybovalo od 54 do 100 %. Signifikantní vzestup protilátek byl pozorován všemi použitými metodami po jednom až třech měsících pobytu telat v teletníku.

Po pěti až šesti měsících pobytu v teletníku došlo k výraznému poklesu v počtu telat se středními a vysokými titry protilátek prokázaných vazbou komplementu, zatímco počet telat se středními titry protilátek stanovených ostatními třemi sérologickými metodami nepoklesl. Dynamiku protilátek detekovaných čtyřmi sérologickými metodami jsme znázornili na obr. 1. Linky představují průměry procent telat se středními a vysokými titry ve všech sledovaných obdobích.

V. Sérologické vyšetření telat proti dvěma antigenům

Serolo- gický test	Sku- pina	Antigen	Doba pobytu v teletníku											
			0			1 měsíc			3 měsíce			5–6 měsíců		
			typ titru protilátek											
			O	S	V	O	S	V	O	S	V	O	S	V
NH	Z ⁺	<i>M. bovirhinis</i>	73	27	0	21	71	8	0	48	52	2	36	62 ⁺⁺
		<i>M. arginini</i>	80	20	0	10	74	16	0	59	41	0	57	43
	J II	<i>M. bovirhinis</i>	87	11	2	41	52	7	2	55	43	6	35	59
		<i>M. arginini</i>	88	12	0	32	54	14	7	67	26	6	77	17
VK	Z	<i>M. bovirhinis</i>	80	20	0	3	59	38	20	80	0	60	36	4
		<i>M. arginini</i>	77	23	0	5	52	43	37	48	15	66	26	8
	J II	<i>M. bovirhinis</i>	69	31	0	10	90	0	15	85	0	53	47	0
		<i>M. arginini</i>	69	31	0	17	68	15	18	70	12	53	47	0

Legenda k tabulce IV a V:

Legenda: + = jednotlivé skupiny obsahovaly cca 50 telat

++ = výsledky jsou uvedeny v procentech

P = podzim, Z = zima, J II = jaro

Typ titru pro jednotlivé reakce: LA IH NH VK
 O = nulový 0 0 0 0
 S = střední 20–80 2–64 8–64 4–16
 V = vysoký 160–640 128–256 128–256 32–64

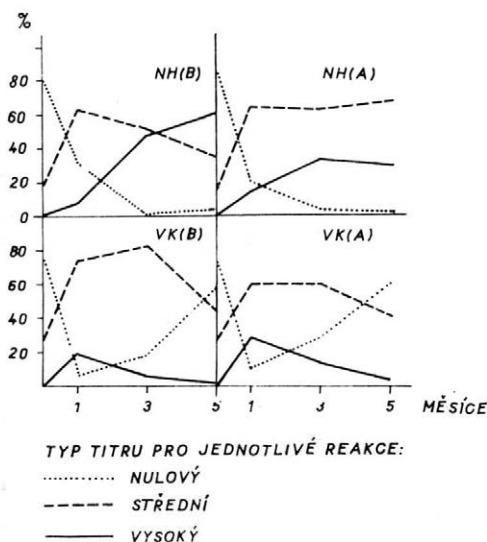
Sérologické testy: La = latexová aglutinace
 IH = inhibice hemaglutinace
 NH = nepřímá hemaglutinace
 VK = vazba komplementu

Výsledky sérologického vyšetření dvou skupin telat proti *M. bovirhinis* a *M. arginini* metodami nepřímé hemaglutinace a vazby komplementu jsme uvedli v tab. V. Po třech měsících pobytu v teletníku byl u telat vzestup hladiny protilátek proti oběma antigenům stanovených těmito dvěma metodami obdobný, jak jsme graficky znázornili na obr. 2. Linky představují průměry z počtu telat s nulovými, středními a vysokými titry, vyjádřené v procentech. Po pěti až šesti měsících pobytu telat v teletníku došlo ke snížení počtu telat se středními a vysokými titry protilátek prokázaných vazbou komplementu proti oběma antigenům, ale počet telat se středními a vysokými titry protilátek stanovených proti oběma antigenům nepřímou hemaglutinací se nesnížil.

Specifita protilátek proti jednotlivým antigenům byla zřejmá zvláště u vysokých titrů v obou reakcích po jednom až třech měsících pobytu. Podrobnějším vyšetřením jedné skupiny o 66 telatech jsme zjistili, že titry protilátek v různých výškách proti oběma antigenům vykazovalo 46 telat, 12 telat reagovalo výlučně s *M. bovirhinis* a 8 telat pouze s *M. arginini*.

2. Dynamika protilátek u telat detekovaných nepřímou hemaglutinací a vazbou komplementu proti *M. bovirhinis* a *M. arginini* v průběhu pěti měsíců

NH — nepřímá hemaglutinace
VK — vazba komplementu
(A) — *M. arginini*
(B) — *M. bovirhinis*
0/0 — procento telat



DISKUSE

Přítomnost mykoplazmat v nosních výtěrech u 71 až 95 % telat s respiračním onemocněním, izolace mykoplazmat z pneumonických plic telat a vzestup sérových protilátek odpovídajících proběhlému klinickému onemocnění, poukázaly na význam mykoplazmat při tomto onemocnění. Prevalence především dvou druhů mykoplazmat, a to *M. bovirhinis* a *M. arginini*, potvrdila dřívější naše výsledky (Menšík aj., 1970, Jurmanová a Krejčí, 1971) a dále také výsledky Nicoleta a de Meurona, 1970, kteří kultivačně a sérologicky vyšetřovali telata s pneumoenteritidami ve Švýcarsku. Jako důkaz, že četnost výskytu obou uvedených druhů není ovlivněna kultivační technikou, kdy v tekutých půdách jsou preferovány zárodky snadno se množící na úkor zárodků pomalu rostoucích, jsme provedli přímou kultivaci nosních výtěrů na pevné půdy. Tato kultivace, jakož i následná identifikace kolonií metodou epi-imunofluorescence (Freundt aj., 1973), se plně osvědčila.

Je třeba však brát v úvahu i další druhy mykoplazmat, které se v nosních výtěrech vyskytly. Tyto druhy, shrnuté pod skupiny *M.sp.*, se vyskytují poměrně často u telat zdravých a dále v pneumonických plicích. Naše nálezy jsou v souladu s literaturou, kdy z 11 druhů boviních mykoplazmat (Leach, 1973), bylo 9 druhů izolováno ve vztahu k respiračnímu traktu (Cottew a Leach, 1969, Karst a Onoviran, 1971, Cottew, 1970).

Při dlouhodobém vyšetřování jsme dospěli k názoru, že ani nemocnost telat ani infekce mykoplazmaty nebyla závislá na ročním období. Je třeba v této spojitosti však vzít v úvahu skutečnost, že jsme vyšetřovali telata v teletnicích s kontinuálním zástavem, kde nově přichází jedinci byli buďto zdrojem infekce novým druhem mykoplazmat nebo vnímavým substrátem pro mykoplazmata již delší dobu v teletniku pasážovaná.

Ve snaze označit některé chovy na farmách za zdroje infekce mykoplazmaty jsme kultivačně opakovaně vyšetřovali telata z 12 farem po dobu 15 měsíců. Výsledky izolací, které v této práci neuvádíme, však ukázaly, že žádný z chovů neměl po celou dobu specifickou mikroflóru mykoplazmat.

Všemi použitými sérologickými metodami jsme prokázali vzestup protilátek proti sledovaným druhům mykoplazmat. Při srovnání jednotlivých metod se vazba komplementu ukázala jako metoda nejlépe informující o proběhlé infekci, neboť většina protilátek za pět až šest měsíců od doby styku s antigenem vymizela. Tato metoda se široce používá v sérologické depistáži pleuropneumonie skotu. Metoda nepřímé hemaglutinace se považuje za nevhodnou pro sledování chronických onemocnění vzhledem k dlouhodobému přetrvání sérových protilátek (Cottew a Leach, 1969), což jsme potvrdili i svými pokusy. Specifitu sérologických reakcí jsme stanovili na poměrně malém počtu vzorků a ve vztahu ke dvěma druhům mykoplazmat. Touto otázkou se budeme zabývat obšírněji a prověříme ji na větším počtu druhů bovinních mykoplazmat.

Literatura

- BOULANGER, P.: Technique of modified direct complement fixation test for viral antibodies in heat inactivated cattle serum. Can. J. comp. Med., 24, 1969, s. 262-269.
- COTTEW, G. S.: Mycoplasma isolated from cattle in Australia. Aust. vet. J., 46, 1970, s. 378-381.
- COTTEW, G. S. — LEACH, R. H.: Mycoplasma of cattle, sheep and goats. Mycoplasmas and L-Phase of Bacteria. New York 1969, s. 527-570.
- DOWDLE, W. R. — ROBINSON, R. Q.: An indirect hemagglutination test for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 116, 1964, s. 947-950.
- FREUNDT, B. A. — ERNØ, H. — BLACK, F. T. — KROGSGAARD-JENSEN, A. — ROSENDAL, S.: Evaluation of reference reagents for mycoplasmas. Ann. N. Y. Acad. Sci., 225, 1973, s. 161-171.
- IDE, P. R.: Developments in veterinary science. The etiology of enzootic pneumonia of calves. Can. vet. J., 11, 1970, s. 194-202.
- JURMANOVÁ, K. — KREJČÍ, J.: The isolation of *Mycoplasma arginini* from calves with pneumonia in Czechoslovakia. Vet. Rec., 89, 1971, s. 585-586.
- JURMANOVÁ, K. — MENŠÍK, J.: Adsorbing and non-adsorbing strains of *Mycoplasma bovirhinis*. Zentbl. VetMed., B, 18, 1971, s. 457-464.
- KARST, O. — ONOVIRAN, O.: Isolation of *Mycoplasma agalactiae* var. *bovis* from the respiratory tract. Br. vet. J., 127, 1971.
- LEACH, R. H.: Further studies on classification of bovine strains of mycoplasmatales with proposal for new species, *Acholeplasma modicum* and *Mycoplasma alkalescens*. J. gen. Microbiol., 75, 1973, s. 138-153.
- MENŠÍK, J. — JURMANOVÁ, K. — HÁJKOVÁ, M.: The role of mycoplasma in the development of the chronic respiratory syndrome in calves and young cattle. I. Isolation of mycoplasma from the pneumonic lungs and upper respiratory tracts of calves reared in large capacity calf house. Docum. vet., 8, 1970, (in press).

MORTON, H. E.: Mycoplasma-latex agglutination reaction. J. Bact., 92, 1966, s. 1196-1206.

NICOLET, J. — MEURON, P. A. de: Isolement et caractérisation de mycoplasmas dans le syndrome de la pneumoentérite du veau. Zentbl. VetMed., B, 10, 1970, s. 1031-1043.

Došlo dne 12. 6. 1975

ЮРМАНОВА К., ГАЙКОВА М., КРЕЙЧИ Й., ЧЕРНА Й. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Участие микоплазмы в заболевании дыхательных путей у телят в крупногабаритных телятниках в ЧССР. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11): 583-593, 1975.

Приблизительно 1000 телят обследовалось клинически, культивационно и серологически в пяти группах в разные периоды года. До перевода в телятники телята были здоровыми и лишь у 20 % их носовых мазков нами изолировалась микоплазма. Эти же телята после 3-недельного пребывания в телятнике заболели. Изоляция микоплазмы из носовых выделений телят в это время была положительной в 70—95 % случаев. Результаты серологических обследований соответствовали клиническим и культивационным диагнозам. Телята до прихода в телятник были (54—100 %) без антител против изучаемых видов микоплазмы, в то время как после 1—3 месяцев пребывания в телятнике содержание антител значительно повысилось. В статье описаны как метод идентификации колоний микоплазм техникой эпи-иммуофлюоресценции, так и последующие серологические тесты: ингибция гемагглютинации, латексовая агглютинация, косвенная гемагглютинация и связывание компонентов.

культивация, эпи-иммуофлюоресценция; серологические тесты

JURMANOVÁ K., HÁJKOVÁ M., KREJČÍ J., ČERNÁ J. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). The Participation of Mycoplasma in the Respiratory Diseases of Calves in Large-Capacity Calf-Houses in the Czechoslovak Socialist Republic. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11): 583-593, 1975.

Clinical, serological, and cultivation trials were performed in approximately 1000 calves in five groups in different seasons. The calves were healthy before coming to the calf-house and mycoplasma was isolated only from 20 % of their nasal smears. After three weeks of stay in the house, the same calves were undergoing a respiratory disease. This time the isolation of mycoplasma from the nasal smears of calves was positive in 70—95 % of the cases. The results of the serological examination were in keeping with the clinical and cultivation findings. Before coming to the house, the calves (54—100 % of the cases) had no antibodies against the studied mycoplasma species; however, the content of antibodies increased significantly after one to three months of stay in the calf-house. The paper describes the method of the identification of mycoplasma colonies by the epi-immunofluorescence technique; furthermore, there are descriptions of the following serological tests: hemagglutination inhibition, latex agglutination, indirect hemagglutination, and complement fixation.

cultivation; epi-immunofluorescence; serological tests

JURMANOVÁ K., HÁJKOVÁ M., KREJČÍ J., ČERNÁ J. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). Anteil der Mykoplasmen an Respirations-erkrankungen von Kälbern in Großkapazitätskälberställen in der ČSSR. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11): 583-593, 1975.

Klinisch, kultivationsmäßig und serologisch untersuchten wir zirka 1000 Kälber in fünf Gruppen in unterschiedlichen Jahreszeitperioden. Vor dem Eintreffen in den Kälberstall waren die Kälber gesund und nur bei 20 % deren Nasensekretausstriche isolierten wir Mykoplasmen. Dieselben Kälber machten nach drei Wochen des Aufenthaltes im Kälberstall Respirationserkrankungen durch. Die Isolation von Mykoplasmen aus Nasenausstrichen der Kälber in dieser Zeit war in 70 bis 95 % der

Fälle positiv. Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen standen im Einklang mit den klinischen und den Kultivationsbefunden. Vor der Überführung in den Kälberstall waren die Kälber in 54 bis 100 % der Fälle ohne Antikörper gegen die untersuchten Mykoplasmaarten, während nach ein- bis dreimonatigem Aufenthalt im Kälberstall der Gehalt an Antikörpern signifikant zunahm. In der vorliegenden Arbeit ist einerseits die Methode der Identifikation von Mykoplasmenkolonien mit Hilfe der Epi-Immunofluoreszenztechnik angeführt, andererseits werden folgende serologische Tests beschrieben: Hämagglutinationsinhibition, Latexagglutination, indirekte Hämagglutination und Komplementbindung.

Kultivation; Epi-Immunofluoreszenz; serologische Tests

Adresa autorů:

RNDr. K. Jurmanová, ing. M. Hájková, MVDr. J. Krejčí, MVDr. J. Černá, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno-Medlánky

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 1/1976 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

budou uveřejněny následující články:

- I. Herzig, J. Raszyk, M. Toullová: Adaptace kuřat na krmivo se sníženým obsahem dusíkatých látek
- J. Mitterpáček, M. Vasil: Klinická forma syngamózy bažantů a její léčba Mebendazolem
- P. Kačmár, A. Šamo: Dynamika změn aktivity laktátdehydrogenázy, leucylarylamidázy a aminotransferázy GOT a GPT v krevní plazmě hydiny po poškození organismu kadmíem a trichlormetanem
- D. Zajíček, J. Páv, M. Dvořák, W. Zahradníková: Hematologické a některé biochemické hodnoty krve jelení zvěře (*Cervus elaphus* L.) přirozeně invadované cizopasníky
- D. Zajíček, J. Páv, M. Dvořák, J. Daněk: Hematologické a vybrané biochemické hodnoty krve černé zvěře (*Sus scrofa* L.) přirozeně invadované parazity po aplikaci anthelmintik
- E. Dobšínská: Krevní obraz beaglů z československého chovu
- J. Komárek, K. Štros, I. Sýkora, I. Kynclová, L. Jadrný, P. Selinger: Hodnoty acidobazické rovnováhy krve některých druhů domácích zvířat

PRŮKAZ PROTILÁTEK PROTI VIRU INFEKČNÍ BOVINNÍ RHINOTRACHEITÍDY (IBR) V RANÉM A POZDNÍM POSTINFEKČNÍM OBDOBÍ

J. Menšík, A. Čepica, M. Hájková, J. Štěpánek, V. Rozkošný

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

MENŠÍK J., ČEPICA A., HÁJKOVÁ M., ŠTĚPÁNEK J., ROZKOŠNÝ V. *Průkaz protilátek proti viru IBR v raném a pozdním postinfekčním období*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 595-608, 1975.

Pro rutinní sérologickou diagnostiku IBR byly modifikovány testy virusneutralizace, nepřímé hemaglutinace a vazby komplementu v mikrosystému. Jako relativně nejcitlivější pro detekci protilátek v rekonvalescentních sérech skotu se jevil test nepřímé hemaglutinace, který dával opakovaně reprodukovatelné výsledky, shodné s testem virusneutralizačním. Po modelové experimentální infekci telat virem IBR se vytvořily primární protilátky, které byly prokazatelné virusneutralizačním testem v přítomnosti komplementu již za šest a sedm dní po infekci. Protilátková odpověď telat byla po prvním styku s antigenem rozdílná a konvenčním virusneutralizačním testem v jednom případě neprokazatelná. Virusneutralizační test s komplementem může být využit jako doplňující sérologická metoda vedle konvenčního virusneutralizačního testu a testu nepřímé hemaglutinace k rozlišení raných a pozdních infekcí virem IBR.

virusneutralizace; vazba komplementu; nepřímá hemaglutinace; mikrometody; protilátky vyžadující komplement; experimentální infekce

Virus IBR (*herpesvirus bovis*) způsobuje smrt plodu, vyvolává respirační onemocnění, encefalitidu, konjunktivitidu a záněty genitálního traktu. Jeho výskyt v našich chovech jsme potvrdili izolací několika kmenů viru ze sporadických případů vzplanutí akutního respiračního syndromu u telat ve velkokapacitních telenících, z případů zánětů spojivek a atypických pneumonií mladých, několikadenních telat (Menšík aj., 1970, Menšík a Rozkošný, 1969). Vzhledem k tomu, že nová organizace chovů skotu v současné době vyžaduje časté přesuny zvířat v rámci kooperačních seskupení zemědělských podniků a mezi specializovanými zemědělskými závody, stává se účinná kontrola infekční boviní rhinotracheitidy a některých dalších virových infekcí prvořadým problémem.

Preventivní sledování frekvence nebezpečných virů v populacích skotu se neobejde bez citlivých a efektivních sérologických metod. V posledních deseti letech byl zaznamenán v sérologické diagnostice lidských virových infekcí značný pokrok umožněný rozvojem mikrometod, automatizací celé řady postupů, jejich standardizací a zavedením citlivých a vysoce potentních virových antigenů a antisér. To vše umožňuje vysokou efektivnost práce i v malých diagnostických laboratořích.

Sérologická diagnostika IBR je založena převážně na průkazu neutralizačních protilátek v krevních sérech a na jejich signifikantním vzestupu v sérech rekonvalescentních. Přesto, že virusneutralizační (VN) test je vysoce citlivý a imunologicky specifický a představuje vlastně standardní metodu, pomocí níž je srovnávána standardnost ostatních sérologických metod, je jeho citlivost snižována tím, že některé viry nejsou kompletně neutralizovány ani v přítomnosti nadbytku protilátek.

Tento jev je vysvětlován různě; disociací viru z komplexů virus-protilátka (Fazekas de St. Groth aj., 1958) a vznikem populace nových virových partikulí, které jsou k neutralizaci refrakterní (Dulbecco aj., 1956), nebo protekčním působením protilátek, které nemají schopnost virus neutralizovat, ale chrání jej před spojením s protilátkou neutralizující (Lafferty, 1963a,b). Infekční komplexy virus-protilátka, které takto vznikají, mohou být úplně neutralizovány přidáním specifického antigamaglobulinu (Ashe a Notkins, 1966, Iwasaki a Ogura, 1968, Majer a Link, 1970, Notkins aj., 1966) nebo komplementu (Schmidt a Lennette, 1961).

Neutralizační protilátky vytvořené částečně v průběhu herpetické infekce (virem *herpes simplex*) jsou komplement dependentní, zatímco ty, které se tvoří později, nejsou na účinku komplementu závislé (Yoshino a Taniguchi, 1964, 1965a,b). Yoshino a Taniguchi (1964) stanovili dynamiku těchto raných, komplement vyžadujících protilátek v sérech králíků infikovaných virem *herpes simplex* a zaznamenali jejich první vzestup již za tři až sedm dní po infekci, s maximem za 14 až 21 den. Zjišťovali také až dvojnásobné zvýšení titru neutralizačních protilátek v rekonvalescentních sérech lidí v přítomnosti komplementu. Obdobný princip ověřili u telat infikovaných virem IBR Rossi a Kiesel (1974).

V sérologické diagnostice virových infekcí se v posledních letech uplatňují některé testy, které nevyžadují (jako VN test) buněčné systémy. U herpetických virů přichází v úvahu test nepřímé hemaglutinace (NHA) a test vazby komplementu (VK). Test NHA pro virus *herpes simplex* popsali Scott aj. (1957) a prokázali, že protilátky, které se v reakci NHA uplatňují, jsou identické s protilátkami neutralizačními (Fulton a Scott, 1958). Fuccillo aj. (1970) přizpůsobili test mikrosystému a takto modifikovaný jej využili Zyambo aj. (1973a,b) a Kirby aj. (1974) v sérologii IBR. Na mikrosystému byla modifikována také původní Kolmerova metoda fixace komplementu (Casey, 1965), která je při sérodiagnostice virových infekcí používána v širším měřítku a byla ověřena v diagnostice primární infekce virem *herpes simplex* u lidí (Ross aj., 1964).

Cílem této práce bylo ověřit možnost použití modifikovaného VN testu, testu NHA a VK pro diagnostiku raných protilátek proti viru IBR.

MATERIAL A METODY

EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE TELAT

K experimentální infekci byla vybrána klinicky zdravá telata bez protilátek proti viru IBR. Byla infikována infekční tkáňovou tekutinou z desáté pasáže kmene R 6 viru IBR, s titrem 10^6 TKID₅₀ v 0,2 ml. Způsob infekce telat je popsán ve výsledcích.

TECHNIKA ODBĚRU KRVE A ZPRACOVÁNÍ SÉR

Krev k sérologickému vyšetření byla odebírána od zvířat v terénu i od experimentálně infikovaných telat do hadiček z plastické hmoty pro jednorázové použití.*) Tento způsob umožňuje téměř sterilní zpracování krevních sér a jejich dlouhodobé skladování při teplotě -20°C (Menšík aj., 1974).

SÉROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Pro všechny sérologické testy uplatněné v práci bylo použito mikrotitrační zařízení „Microtiter“ (Dynatech AG), umožňující pracovat s objemy 0,025 a 0,05 ml na plastických plotnách s 96 jamkami s rovným dnem (Limbro), nebo se zakulaceným dnem ve tvaru U (Cooke Engineering Co.).

BUNĚČNÉ KULTURY

Pro vlastní VN test jsme používali buněčnou kulturu stabilní linie FBT, derivovanou z tracheální sliznice bovinního fétu (Machatková a Pospíšil, 1975), nebo linie MDBK. Pro pomnožení viru byly používány primární kultury fetálních hovězích ledvin (FBL). Buňky byly kultivovány v médiu MEM a buněčná suspenze pro VN test byla připravena v médiu obohaceném 30 % fetálního hovězího séra.

VIRUS

Pracovali jsme s kmenem R 6 viru IBR, který byl izolován ze spojivky telete Menšíkem a Rozkošným (1969). Zásobní virová suspenze byla po odstředění buněčného detritu rozplněna do ampulí a skladována při teplotě -60°C . Titr viru (TKID₅₀) byl stanoven v mikrosystému pro objemové množství 0,05 ml na plotnách a odečten za 48 hodin.

PŘÍPRAVA ANTIGENU PRO TEST NHA A VK

Kompletní porost primárních buněčných kultur embryonálních telecích ledvin v Roux lahvích byl infikován dávkou 0,001 TKID₅₀ viru na jednu buňku a po 45minutové adsorpci byl propláchnut Earlovým médiem bez séra a Roux láhev byla doplněna na původní objem tímto médiem bez séra.

V době předpokládaného rozvoje cytopatického efektu (CPE), tj. v době tvoření prvních ložisek v buněčném porostu, bylo z Roux láhve slito médium a buňky byly sterilními skleněnými kuličkami setřepány do roztoku PBS, přidaného v množství rovnajícím se 1/100 objemu původního média.

Imned po setřepání byla suspenze ozvučena ultrazvukovým desintegrátorem UD-100 při 20 KHz po dobu 1, 2, 3, 5 a 10 minut. Takto připravený antigen byl po odstředění při 3000 otáčkách za minutu rozplněn po 1 ml a skladován při teplotě -60°C .

Stejným způsobem byl připraven i antigen kontrolní z neinfikovaných buněčných kultur.

VIRUSNEUTRALIZAČNÍ TEST

Séra byla ředěna v médiu MEM bez séra v objemech 0,05 ml v postupných dvojnásobných ředěních ve čtyřech řadách na mikroplošných. Po přidání 100 TKID₅₀ viru v objemu 0,05 ml a protřepání 1 minutu na třepače následovala hodinová inkubace při pokojové teplotě. Buněčná suspenze byla přidána v množství 0,05 ml a hustotě 500 000 buněk v 1 ml média MEM s přidavkem 30 % fetálního bovinního séra.

Plotny byly inkubovány při teplotě 37°C v atmosféře s 5 % CO₂ a CPE byl odečten za 48 hodin. První ředění viru bez séra, známé pozitivní a negativní sérum, buňky bez viru se sérem a samotná buněčná suspenze sloužily jako kontroly.

*) Pravdova hematologická souprava. Výrobce Koh-i-noor, n. p., Dalečín.

VIRUSNEUTRALIZAČNÍ TEST S KOMPLEMENTEM (VNK)

Pro průkaz raných protilátek bylo postupováno podle metody Yoshino a Taniguchi (1964, 1965a, b). V podstatě byl zachován postup jako pro konvenční VN test.

Séra byla ředěna v objemech 0,025 ml a po přidání 0,025 ml filtrovaného morčecího komplementu (10 hemolytických jednotek) a 100 TKID₅₀ viru v objemu 0,025 ml byla tato směs inkubována hodinu při pokojové teplotě. Na kontrolních plotnách byla smíchána tatáž množství stejných sér, viru a komplementu, který však byl před rozplněním inaktivován 30 minut při teplotě 56 °C. Po ukončené inkubaci bylo do obou směsí přidáno po 0,075 ml buněčné suspenze obsahující 400 000 buněk v 1 ml média s 30 % fetálního bovinního séra.

TEST NEPŘÍMÉ HEMAGLUTINACE

Pro mikrotest jsme modifikovali metodu Whitmana a Hetricka (1965) a Soběslavského a Vojtěchovského (1967).

Bovinní séra byla před vyšetřením inaktivována 30 minut při teplotě 56 °C a vysycena přes noc stejným objemem neředěné suspenze ovčích erytrocytů.

Ovčí erytrocyty odebrané do Alseverova roztoku a třikrát prané byly v 6% suspenzi senzibilizovány stejným objemem kyseliny taninové, ředěné 1:15 000, při teplotě 37 °C 20 minut a znovu třikrát proprány v PBS, pH 7,2. Tříprocentní suspenze senzibilizovaných erytrocytů v PBS, pH 6,4, byla smíchána se stejným množstvím optimálního ředění antigenu rovněž v PBS, pH 6,4, a inkubována 20 minut při teplotě 37 °C. Optimální ředění antigenu bylo předem určeno boxovou titrací proti známému pozitivnímu séru. Po proprání v PBS, pH 7,2, obsahujícím 1 % normálního králíčího inaktivovaného séra, byla připravena ve stejném ředidle 1 1/2 % suspenze erytrocytů pro vlastní test.

Ke dvojnásobným ředěním sér bylo přidáno stejné množství erytrocytů s navázaným antigenem a současně byla séra vyšetřena kontrolní suspenzí taninovaných krvinek bez antigenu pro vyloučení nespecifických reakcí. Smícháním opracovaných

I. Výsledky opakovaných titrací viru IBR a osmi sér

Číslo pokusu	Titry čtyř šarží viru (log 10)				Titry protilátek v sérech					
					1		2		3	
	1	2	3	4	A	B	A	B	A	B
1	5,5	6,5	3,5	5,25	64	128	32	64	16	32
2	5,75	7,25	3,75	6,25	32	64	32	64	8	8
3	5,75	6,25	2,75	5,25	32	128	64	128	8	16
4	6,25	7,5	3,5	4,75	16	64	32	64	8	8
5	6,25	6,5	3,75	4,75	64	128	64	128	8	8
6	6,5	7,75	3,75	5,5	32	64	32	64	8	8
7	5,5	7,25	3,5	5,25	32	64	32	64	8	16
8	6,5	7,75	4,25	5,5	32	32	16	32	8	8
9	5,5	6,25	3,5	4,75	64	128	64	128	16	32
10	6,5	7,5	4,5	5,5	64	32	64	128	16	16
11	5,75	6,5	4,25	5,5	32	64	32	64	16	16
12	6,5	7,75	4,25	5,5	32	64	32	32	8	8

A — dávka viru 100—1000 TKID₁₁

B — dávka viru 10—100 TKID₁₁

erytrocytů s ředidlem byla získána kontrola pro případ nespecifické aglutinace. Test byl posouzen po hodinové inkubaci při laboratorní teplotě a za pozitivní byla považována 75 až 100% aglutinace erytrocytů.

REAKCE VAZBY KOMPLEMENTU

V našich podmínkách jsme postupovali podle metody popsané Schmidtovou (1969).

Komplement byl titrován v přítomnosti používaného antigenu a pracovní ředění antigenu bylo stanoveno boxovou titrací v mikrosystému.

Ve vlastním testu byla séra naředěna v postupných dvojnásobných ředěních v objemu 0,025 ml. V každé sérii vyšetření byla séra přetestována na antikomplementaritu a pro kontrolu specifity bylo zařazeno vždy známé pozitivní a negativní sérum. Kontrola komplementu se specifickým a nespecifickým antigenem, kontrola hemolytického systému a buněk doplňovaly každou sérii vyšetření. Po přidání 0,025 ml antigenu (2 jednotky) a 0,025 ml komplementu (2 jednotky) ke každému ředění séra byly plotny dokonale protřepány 1 minutu na vibrační třepače a v uzavřeném ige-litovém sáčku byly pak uloženy přes noc v chladničce při teplotě +4 °C. Druhý den, po předchozím předeřtání na pokojovou teplotu, byl přidán do jednotlivých důlků hemolytický systém v množství 0,05 ml. Po dokonalém protřepání na třepače následovala inkubace 20 minut v termostatu při teplotě 37 °C. Plotny pak byly uloženy v chladničce až do usazení nerozpuštěných krvinek a výsledek odečten.

VÝSLEDKY

TEST VIROVÉ NEUTRALIZACE

Standardizace metodiky byla zajištěna opakovanou titrací čtyř šarží zásobního viru na různých šaržích MDBK a opakovaným vyšetřením osmi vzorků sér proti dvěma různým dávkám viru (100 a 1000 TKID₅₀) (tab. I).

Titry protilátek v sérech									
4		5		6		7		8	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
16	16	8	16	8	8	2	4	4	4
8	8	4	8	4	8	2	2	2	2
8	16	8	16	4	16	4	4	2	2
8	16	8	16	4	8	2	4	2	2
16	16	8	32	8	16	4	4	2	4
8	16	8	16	4	8	2	4	2	2
8	16	8	16	8	16	2	4	2	4
4	8	8	8	4	8	2	4	2	2
16	32	8	32	16	16	4	8	2	4
8	16	4	16	8	16	4	8	2	2
8	16	8	16	4	16	4	4	2	2
8	8	8	16	8	8	4	4	2	2

Při použití 100 TKID₅₀ viru byl titr sér přibližně o jedno ředění vyšší než při použití 1000 TKID₅₀ viru. Opakované vyšetření potvrdilo dobrou reprodukovatelnost testu.

TEST NEPŘÍMÉ HEMAGLUTINACE

II. Kontrola reprodukovatelnosti výsledků testu NHA

Vzorek číslo	Titr séra při vyšetření	
	I	II
1	0	0
2	128	128
3	0	0
4	32	16
5	0	0
6	4	4
7	64	8
8	16	4
9	16	8
10	256	128
11	32	16
12	256	64
13	128	64
14	1024	512
15	16	8
16	256	64
17	64	64
18	64	32
19	32	16
20	32	64

Reprodukovatelnost výsledků byla ověřena opakovaným vyšetřením krevních sér získaných za různou dobu po experimentální infekci telat. Interval mezi oběma vyšetřeními byl sedm dní (tab. II).

TEST VAZBY KOMPLEMENTU

Metoda přípravy antigenu byla ověřena boxovou titrací tří různých šarží antigenu proti známému pozitivnímu séru (tab. III). Titr jednotlivých šarží antigenu sice kolísal, ale i v různých ředěních dával poměrně stabilní titry séra.

Pro srovnání všech tří testů bylo vyšetřeno několik souborů krevních sér telat, krav a býků (tab. IV). Hodnocení těchto souborů ukázalo, že test NHA je o něco citlivější než test VN, zatímco test VK v tomto provedení je pro rutinní diagnostiku málo vhodný.

Pro individuální srovnání byla vybrána některá pozitivní séra a porovnán výsledek vyšetření podle výšky zjištěných titrů protilátek (tab. V). Také v této sestavě se ukázal test NHA o něco citlivější než test VN. Většina sér postrádala komplementfixační protilátky.

PRŮKAZ RANÝCH PROTILÁTEK PO PRIMÁRNÍ INFEKCI TELAT VIREM IBR

K ověření dynamiky protilátek proti viru IBR všemi propracovanými sérologickými metodami jsme infikovali čtyři klinicky zdravá telata virem IBR. Telata č. 1 a 2 dostala intratracheálně 10 ml virové suspenze, teleti č. 3 bylo aplikováno 15 ml virové suspenze intravenózně a teleti č. 4 10 ml suspenze intratracheálně a 5 ml intranazálně.

U telat se vyvinulo charakteristické lokální i celkové onemocnění bez vážnějších komplikací.

Výsledky pokusu, ve kterém byla použita vysoká infekční dávka, ukázaly, že protilátková odpověď telat je individuálně značně rozdílná a že použití jediného testu (např. konvenčního testu virové neutralizace) nemusí dát uspokojivou odpověď.

III. Boxová titrace tří šarží antigenu IBR s pozitivním sérem

Ředění antigenu	Ředění séra						Kontrola komplementu			
	2	4	8	16	32	64	2 j.	1,5 j.	1 j.	1/2 j.
I										
2	++++	++++	++++	0	0	0	0	0	0	++++
4	++++	++++	++++	0	0	0	0	0	0	++++
8	++++	++++	+	0	0	0	0	0	0	++++
16	++++	0	0	0	0	0	0	0	0	++++
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++++
negativní sérum	0	0	0	0	0	0				
II										
2	++++	++++	++++	++++	0	0	0	0	0	++++
4	++++	++++	++++	++++	0	0	0	0	0	++++
8	++++	++++	++++	++++	0	0	0	0	0	++++
16	++++	++++	++++	0	0	0	0	0	0	++++
32	++++	++++	0	0	0	0	0	0	0	++++
negativní sérum	0	0	0	0	0	0				
III										
2	++++	++++	++++	++++	++++	0	0	0	0	++++
4	++++	++++	++++	++++	++	0	0	0	0	++++
8	++++	++++	++++	++++	+	0	0	0	0	++++
16	++++	++++	++++	++++	++	0	0	0	0	++++
32	++++	++++	++++	++++	0	0	0	0	0	++++
64	++++	++++	0	0	0	0	0	0	0	++++
negativní sérum	0	0	0	0	0	0				

IV. Výsledky vyšetření různých vybraných skupin skotu

Kategorie zvířat	Původ	Titry protilátek v jednotlivých testech										Vyšetřeno celkem
		VK			NHA			VN				
		<2	2-8	>16	<4	4-16	>32	<2	2-4	8-32	>32	
Plemenní býci	import	0	4	3	0	3	4	2	3	2	0	7
Telata	VKT-Č.	50	8	1	42	8	9	48	9	2	0	59
Telata	VKT-T.											
	I (21. 3.)	27	1	0	23	5	0	26	2	0	0	28
	II (13. 4.)	30	0	0	26	4	0	27	3	0	0	30
	III (6. 7.)	25	0	0	25	0	0	25	0	0	0	25
	IV (25. 7.)	29	0	0	29	0	0	29	0	0	0	29
Krávy	S.	57	9	0	25	16	25	26	9	20	11	66

V. Srovnání výsledků vyšetření jednotlivých vzorků

Vzorek č.	VK	NHA	VN
1	<2	8	8
2	<2	8	6
7	<2	128	32
8	<2	256	8
9	4	256	16
10	<2	64	16
13	<2	4	<2
14	<2	16	16
22	8	256	32
27	<2	32	> 64
29	4	64	32
32	<2	64	8
34	<2	8	16
35	<2	128	> 64
36	16	256	> 64
37	<2	4	8
44	8	128	32
47	<2	128	32
48	<2	32	16
49	<2	32	32

VI. Dynamika protilátek u experimentálně infikovaných telat

Dny po infekci	Tele č. 1				Tele č. 2			
	titr protilátek v testu							
	VN	VNK	VK	NHA	VN	VNK	VK	NHA
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	4	0	4	0	8	0	0
10	8	64	16	1024	8	128	0	16
12	32	64	16	1024	32	64	2	32
17	32	64	8	256	32	32	2	32
21	16	16	8	128	64	16	4	64
26	8	8	16	64	32	16	4	32
36	4	8	16	64	16	16	2	32

VII. Dynamika protilátek u experimentálně infikovaných telat

Dny infekce	Tele č. 3				Tele č. 4			
	titr protilátek v testu							
	VN	VNK	VK	NHA	VN	VNK	VK	NHA
0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	8	0	0	0	4	0	4
9	0	16	4	128	0	8	16	32
14	0	32	4	64	8	256	16	256
17	0	64	16	32	16	256	32	256
19	0	256	32	32	16	256	64	512
26	0	64	64	32	16	256	32	1024
34	0	64	64	1024	16	256	64	512
41	0	32	8	512	8	128	0	16
48	0	16	8	2048	4	32	32	2048
69	0	8	32	8192	8	32	64	8192

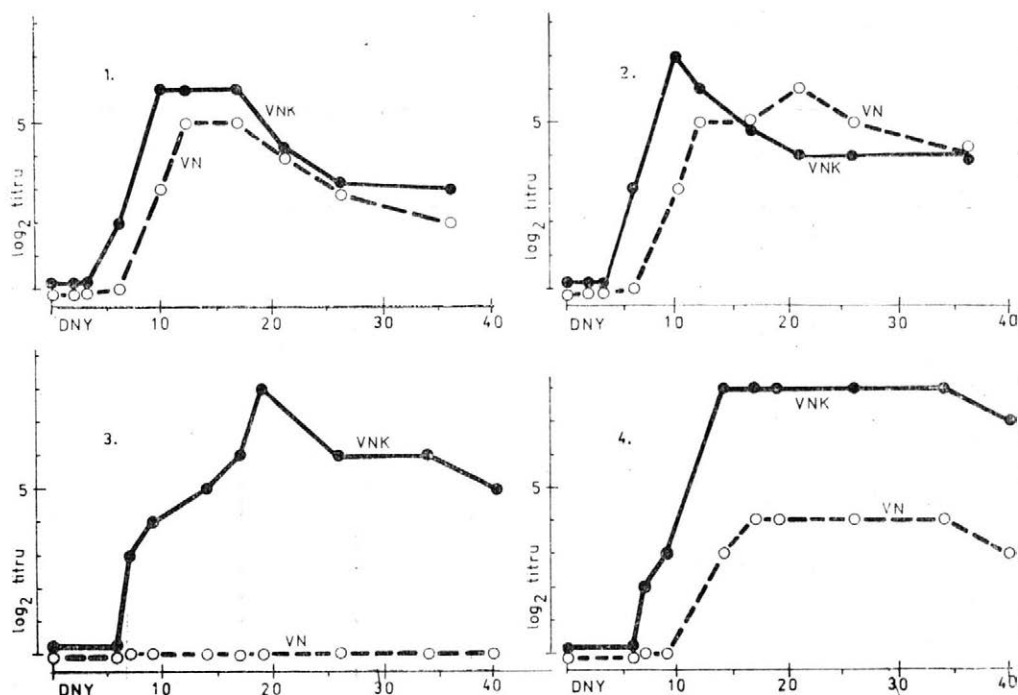
Výsledky vyšetřování všemi sérologickými metodami jsou uvedeny v tab. VI a VII a dynamika raných protilátek ve srovnání s pozdními protilátkami je znázorněna graficky (obr. 1).

První prokazatelné neutralizační protilátky vyžadující komplement se objevily v krevním séru telat nezávisle na způsobu infekce za šest až sedm dní po infekci, s maximem za 10, 14 a 19 dní. Výrazné rozdíly mezi jednotlivými zvířaty se projeví v nástupu i v titru neutralizačních protilátek nevyžadujících komplement. I když se objevily v krvi některých telat již za 10 nebo 14 dní po infekci (tele č. 1, 2, 4), zůstaly jejich hladiny velmi nízké. U telete č. 3 nebyly po celou dobu pozorování neutralizační protilátky bez přítomnosti komplementu prokázány (tab. VII, obr. 1).

HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUSE

Výsledky, kterých jsme dosáhli s modifikovanou metodou nepřímé hemaglutinace v mikrosystému, odpovídají výsledkům jiných autorů (Z y a m b o aj., 1973a,b; K i r b y aj., 1974). Metoda je dostatečně citlivá a dává reprodukovatelné výsledky. Na rozdíl od vazby komplementu může být v této modifikaci doporučena k praktickému využití v diagnostických laboratořích.

Metoda vazby komplementu je v konvenčním provedení relativně málo citlivá a musí být pro diagnostiku virových infekcí telat ještě v některých podrobnostech propracována. Podobné problémy byly zaznamenány i v diagnostice lidských virových infekcí. Ukázalo se totiž, že u velmi mladých jedinců mají komplementfixační protilátky proti některým virům



1. DYNAMIKA RANÝCH PROTILÁTEK PO EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCI TELAT VIREM IBR

●—●— neutralizační protilátky závislé na komplementu
 —○—○— neutralizační protilátky nevyžadující komplement

vyšší požadavky na antigen, než jsou původně užívané dvě jednotky antigenu, stanovené podle výsledku boxové titrace. Použití čtyř až osmi jednotek zvýšilo citlivost testu při diagnostice parainfluenzy (Chanoek, 1969), respiračního syncytiálního viru (Chanoek aj., 1961, Ross aj., 1964) a primární infekce virem *herpes simplex* (Ross aj., 1964).

Bylo také zjištěno, že protilátky proti některým virovým antigenům v hovězích sérech reagují velmi slabě ve standardním KF testu, v němž se používá morčecí sérum jako zdroj komplementu. Reakce se zlepšila po přidání nezahřátého hovězího séra (Boulanger a Bannister, 1960).

Standardní a reprodukovatelné výsledky jsme zaznamenali i s VN testem v mikrosystému. Test je v této modifikaci vhodný k zavedení do praxe.

V našem pokuse na sérologicky negativních telatech jsme prokázali, že protilátky vznikající v prvních sedmi dnech po primární infekci virem IBR jsou stejně jako u viru *herpes simplex* (Yoshino a Taniguchi, 1964) detekovatelné jen v přítomnosti komplementu. Podobné výsledky zaznamenali také Rossi a Kiesel (1974), kteří sledovali tvorbu protilátek proti viru IBR po vakcinaci živou avirulentní vakcínou.

Virus IBR vyvolává podobně jako virus *herpes simplex* latentní infekce, které mohou být reaktivovány (Sheffy a Davis, 1972, Snowdon, 1965). Také v podmínkách *in vitro* může infekční virus vystavený účinku protilátky perzistovat ve formě komplexu virus-protilátka (Ashe a Notkins, 1966). Na tuto možnost upozornili již

Fazekas de St. Groth a Webster (1962), kteří vyslovili obecný imunologický názor, že v reverzibilním spojení viru s protilátkou mají virové částice šanci zůstat volné a zachovat si infektivitu nebo vytvořit s protilátkou pevnější spojení, které má za následek ztrátu infekivity.

Existenci infekčního viru LD (Lactic Dehydrogenase Virus) ve formě komplexu virus-protilátka prokázali poprvé u myši Notkins aj. (1966). Podobný stav byl pozorován u Aleutské choroby norků (Porter a Larsen, 1967) a u viru *herpes simplex* (Ashe a Notkins, 1966). Přítomnost specifické protilátky v těchto komplexech mohla být prokázána příslušným antigamaglobulinem, jehož funkce je vysvětlována neutralizací nebo stabilizací komplexu.

I když skutečná funkce termolabilní komponenty při potencování neutralizačního účinku protilátky není dosud jasná, má použití komplementu v detekci protilátek vytvořených po primární infekci virem *herpes simplex* rozhodující význam. Bylo zjištěno, že komplement ovlivňuje neutralizaci viru jen v přítomnosti raných protilátek typu 19 S a 7 S, popřípadě také pozdních 19 S protilátek; neutralizační efekt pozdních 7 S protilátek komplement neovlivnil (Hamparaj., 1968, Yoshino a Taniguchi, 1965a,b). Také výsledky našich pokusů, podobně jako práce jiných autorů (Yoshino a Taniguchi, 1964, Rossi a Kiesel, 1974), poukazují na možnosti detekce protilátek proti viru IBR již během prvního týdne po infekci. Průkazu komplement dependentních protilátek v jediném vzorku séra může být tak využito v diagnostice čerstvých primárních infekcí. Za závažné považujeme také zjištění, že i masivní infekce virem IBR vyvolává u telat značně rozdílnou protilátkovou odpověď, která v jednom případě nebyla konvečním VN testem prokázána vůbec (tele č. 3).

Na rozdíl od jiných autorů pokusili jsme se sledovat dynamiku časných protilátek po primární infekci také testem NHA a VK. První pozitivní výsledky jsme u dvou telat (č. 1 a 4) zaznamenali současně testem NHA a VNK za šest a sedm dní po infekci. Za devět a deset dní po infekci byly (s výjimkou telete č. 3) protilátky prokazatelné již všemi použitými testy.

Pro zpřesnění sérologické diagnostiky IBR, zejména pokud jde o rozlišení primární infekce od infekcí staršího data, může být s výhodou použito VNK testu a při komplexním zpracování krevních sér testem VN, VNK a NHA se může očekávat, že procento zachycených pozitivních případů bude vyšší.

Literatura

ASHE, W. K. — NOTKINS, A. L.: Neutralization of an infectious herpes simplex virus-antibody complex by anti-gamma-globulin. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A., 56, 1966, s. 447-451.

BOULANGER, P. — BANNISTER, G. L.: A modified direct complement fixation test for the detection of antibodies in the serum of cattle previously infected with vesicular stomatitis virus. J. Immun., 85, 1960, s. 1076-1080.

CASEY H. L., 1965, cit. SCHMIDT, N. J. — LENNETTE, E. H.: Advances in the sero-diagnosis of viral infections. Prog. med. Virol., 15, 1973, s. 244-308.

CHANOCK, R. M.: Parainfluenza viruses. In: Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections. New York 1969. 434 s.

CHANOCK, R. M. — KIM, H. W. — VARGOSKO, A. J. — DELEVA, A. — JOHNSON, K. M. — CUMMING, C. — PARROTT, R. H.: Respiratory syncytial virus. I. Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory disease in children. *J. Am. med. Ass.* 176, 1961, s. 647-653.

DULBECCO, R. — VOGT, M. — STRICKLAND, L. G. R.: A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses: Western equine encephalitis and poliomyelitis virus. *Virology*, 2, 1956, s. 162-205.

FAZEKAS DE ST. GROTH, S. — WATSON, G. S. — REID, A. F.: The neutralization of animal viruses. I. A model of virus-antibody interactions. *J. Immun.*, 80, 1958, s. 215-224.

FAZEKAS DE ST. GROTH, S. — WEBSTER, R. G.: The neutralization of animal viruses. IV. Parameters of the influenza virus-antibody system. *J. Immun.*, 90, 1962, s. 151-164.

FELTON, F. G. — SCOTT, L. V.: Studies on hemagglutination with *herpes simplex* virus. I. Adsorption studies as evidence that the antigen-antibody reaction is specific and the neutralizing and hemagglutinating antibodies are identical. *J. Immun.*, 80, 1958, s. 186-188.

FUCCILLO, D. A. — MODER, F. L. — CATALANO, L. W. — VINCENT, M. M. — SEVER, J. L.: *Herpesvirus hominis* types I and II. A specific microindirect hemagglutination test. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 133, 1970, s. 735-739.

HAMPAR, B. — NOTKINS, A. L. — MAGE, M. — KEEHN, M. A.: Heterogeneity in the properties of 7S and 19S rabbit-neutralizing antibodies to herpes simplex virus. *J. Immun.*, 100, 1968, s. 586-594.

IWASAKI, T. — OGURA, R.: Studies on neutralization of Japanese encephalitis virus (JEV). I. Further neutralization of the resistant fraction by an interaction between antiviral IgG antibody and IgG heterotype or allotype antibody. *Virology*, 34, 1968, s. 141-148.

KIRBY, F. D. — MARTIN, H. T. — OSTLER, D. C.: An indirect haemagglutination test for the detection and assay of antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Vet. Rec.*, 94, 1974, s. 361-362.

LAFFERTY, K. J.: The interaction between virus and antibody. I. Kinetic studies. *Virology*, 21, 1963a, s. 61-75.

LAFFERTY, K. J.: The interaction between virus and antibody. II. Mechanism of the reaction. *Virology*, 21, 1963b, s. 76-90.

MACHATKOVÁ, M. — PŮSPÍŠIL, Z.: Biological characteristics of cell lines derived from the respiratory tract of a bovine foetus. *Folia biol.*, Praha, 1975 (in press).

MAJER, M. — LINK, F.: Studies on the non-neutralizable fraction of vaccinia virus. *Clin. exp. Immun.*, 7, 1970, s. 283-291.

MENŠÍK, J. — ČEPICA, A. — FRANZ, J. — HÁJKOVÁ, M. — KREJČÍ, J. — MACHATKOVÁ, M. — ROZKOŠNÝ, V. — SUCHÁNKOVÁ, A. — ŠTĚPÁNEK, J.: Sérologická diagnostika respiračních virů. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1974. 47 s.

MENŠÍK, J. — ROZKOŠNÝ, V. — MESÁROŠ, E. — KREJČÍ, J. — POSPÍŠIL, Z. — VALÍČEK, L. — JURMANOVÁ, K. — FRANZ, J. — HÁJKOVÁ, M. — PLEVA, V.: Výzkum etiologie, diagnostiky a prevence virových respiračních a střevních infekcí skotu. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1970. 77 s.

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

NOTKINS, A. L. — MAHAR, S. — SCHEELE, C. — GOFFMAN, J.: Infectious virus-antibody complex in the blood of chronically infected mice. *J. exp. Med.*, 124, 1966, s. 81-97.

PORTER, D. — LARSEN, A. E.: Aleutian disease of mink: infectious virus-antibody complexes in the serum. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 126, 1967, s. 680-684.

ROSS, C. A. C. — RUSSELL, W. C. — WILDY, P.: Herpes antigens from hamster kidney cell cultures in the diagnosis of primary and recurrent infections. *Arch. ges. Virusforsch.* 15, 1964, s. 58-66.

ROSSI, C. R. — KIESEL, G. K.: Complement-requiring neutralizing antibodies in cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Arch. ges. Virusforsch.*, 45, 1974, s. 328-334.

SCHMIDT, N. J.: Complement fixation technique for assay of viral antigens and antibodies. *Fundamental Techniques in Virology*. New York, London, Academic Press 1969, s. 263.

SCHMIDT, N. J. — LENNETTE, E. H.: Recent advances in the serodiagnosis of virus infections. *Prog. med. Virol.*, 3, 1961, s. 1-58.

SCOTT, L. V. — FELTON, F. G. — BARNEY, J. A.: Hemagglutination with *herpes simplex* virus. *J. Immun.*, 78, 1957, s. 211-213.

SHEFFY, B. E. — DAVIS, D. H.: Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 140, 1972, s. 974-976.

SNOWDON, W. A.: The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust. vet. J.*, 41, 1965, s. 135-142.

SOBĚSLAVSKÝ, O. — VOJTĚCHOVSKÝ, K.: Laboratorní diagnostika infekcí vyvolaných *Mycoplasma pneumoniae*. *Zprávy Epidem. Mikrobiol.*, 9, 1967, s. 21-37.

WHITMAN, J. E. — HETRICK, M. F.: An indirect hemagglutination test for detecting antibody to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Cornell Vet.*, 55, 1965, s. 613-622.

YOSHINO, K. — TANIGUCHI, S.: The appearance of complement requiring neutralizing antibodies by immunization and infection with herpes simplex virus. *Virology*, 22, 1964, s. 193-201.

YOSHINO, K. — TANIGUCHI, S.: Studies on the neutralization of *herpes simplex* virus. I. Appearance of neutralizing antibodies having different grades of complement requirement. *Virology*, 26, 1965a, s. 44-53.

YOSHINO, K. — TANIGUCHI, S.: Studies on the neutralization of *herpes simplex* virus. III. Mechanism of the antibody-potentiating action of complement. *Virology*, 26, 1965b, s. 61-72.

ZYAMBO, G. C. N. — DENNETT, D. P. — JOHNSON, R. H.: A passive haemagglutination test for the demonstration of antibody to infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. 1. Standardization of test components. *Aus. vet. J.*, 49, 1973a, s. 409-413.

ZYAMBO, G. C. N. — ALLAN, P. J. — DENNETT, D. P. — JOHNSON, R. H.: A passive haemagglutination test for the demonstration of antibody to infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus. 2. Studies on antibody incidence and the serological response after infection. *Aust. vet. J.*, 49, 1973b, s. 413-417.

Došlo dne 12. 6. 1975

МЕНЬШИК Я., ЧЕПИЦА А., ГАЙКОВА М., ШТЕПАНЕК Я., РОЗКОШНЫ В. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Доказательство антител против вируса IBR в раннем и позднем периоде после инфекции. *Vet. Med. (Praha)* 20 (10-11): 595-608, 1975.

Для обычной серологической диагностики IBR были модифицированы тесты вируснейтрализации, непрямой гемагглютинации и связывания комплемента в микросистеме. В качестве относительно наиболее чувствительных антител для детектирования в реконвалесцентных сыворотках крупного рогатого скота оказался тест непрямой гемагглютинации, который давал повторно воспроизводимые результаты, подобные тесту вируснейтрализации. После модельной экспериментальной инфекции телят вирусом IBR образовались первичные антитела, которые были доказуемы вируснейтрализационным тестом при наличии комплемента уже спустя 6-7 дней после инфекции. Реакция антитела телят после первого контакта с антигеном была разной и в одном случае недоказуемой обусловленным вируснейтрализационным тестом. Вируснейтрализационный тест с комплементом может быть использован в качестве дополнительного серологического метода, наряду с обусловленным вируснейтрализационным тестом и тестом непрямой гемагглютинации, для отличия ранних и поздних инфекций вирусом IBR.

вируснейтрализация; связывание комплемента; непрямая гемагглютинация; микрометоды; антитела требующие комплемент; экспериментальная инфекция

MENŠÍK J., ČEPICA A., HÁJKOVÁ M., ŠTĚPÁNEK J., ROZKOŠNÝ V. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). *The Demonstration of the Antibodies against the IBR Virus during the Early and Late Post-Incubation Period.* Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 595-608, 1975.

The virus neutralization test, indirect hemagglutination test, and complement-fixation test were modified in the microsystem for routine serological diagnosis of IBR. The indirect hemagglutination test was found as the relatively most sensitive test for the detection of antibodies in the convalescent serums of cattle; the reproducible results obtained repeatedly by this test were the same as those obtained by the virus-neutralization test. The model experimental infection of calves with the IBR virus produced primary antibodies detectable by the virus-neutralization test in the presence of complement already six or seven days after infection. After the first contact with the antigen, the antibody response of the calves was different and not detected by the routine virus-neutralization test in one case. The virus-neutralization test with complement can be used as an additional serological method, besides the conventional virus-neutralization test and the indirect hemagglutination test for the distinction between early and late IBR virus infections.

virus-neutralization; complement fixation; indirect hemagglutination; micromethods; antibodies requiring complement; experimental infection

MENŠÍK J., ČEPICA A., HÁJKOVÁ M., ŠTĚPÁNEK J., ROZKOŠNÝ V. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Nachweis von IBR-Virus-Antikörpern in der frühen und späten Postinfektionsperiode.* Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 595-608, 1975.

Für die routinierte serologische IBR-Diagnostik wurde der Virusneutralisationstest, der indirekte Hämagglutinationstest und der Komplementbindungstest im Mikrosystem modifiziert. Als relativ sensitivster Test zur Detektion von Antikörpern in Rekonvaleszenzseren von Rindern erwies sich die indirekte Hämagglutination. Dieser Test erbrachte mit dem Virusneutralisationstest übereinstimmende, wiederholt reproduzierbare Ergebnisse. Nach einer experimentellen Modellinfektion der Kälber mit dem IBR-Virus bildeten sich primäre Antikörper, die mit Hilfe des Virusneutralisationstestes in Anwesenheit des Komplements bereits in sechs bis sieben Tagen nach der Infektion nachweisbar waren. Die Antikörperreaktion der Kälber war nach erstem Kontakt mit dem Antigen unterschiedlich und mit Hilfe des konventionellen Virusneutralisationstestes in einem Fall nicht nachweisbar. Der Virusneutralisationstest mit dem Komplement kann als ergänzende serologische Methode neben dem konventionellen Virusneutralisationstest und dem indirekten Hämagglutinationstest zur Unterscheidung der frühen und späten IBR-Virusinfektionen ausgenutzt werden.

Virusneutralisierung; Komplementbindung; indirekte Hämagglutination; Mikromethoden; Komplement erfordernde Antikörper; experimentelle Infektion

Adresa autorů:

Doc. MVDr. J. Menšík, CSc., MVDr. A. Čepica, ing. M. Hájková, MVDr. J. Štěpánek, MVDr. V. Rozkošný, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno-Medlánky

VYUŽITÍ KOMPLEXNÍ VIROLOGICKÉ TECHNIKY K PŘÍMÉMU PRŮKAZU VIRŮ PI-3 A IBR V ORGÁNECH INFIKOVANÝCH TELAT

J. Menšík, Z. Pospíšil, A. Suchánková, A. Čepica, V. Rozkošný, B. Šmíd, M. Machatková

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

MENŠÍK J., POSPÍŠIL Z., SUCHÁNKOVÁ A., ČEPICA A., ROZKOŠNÝ V., ŠMÍD B., MACHATKOVÁ M. *Využití komplexní virologické techniky k přímému průkazu virů PI-3 a IBR v orgánech infikovaných telat.* Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 609-622, 1975.

Komplexním zpracováním sedmi telat experimentálně infikovaných virem PI-3 a tří telat infikovaných virem IBR byla ověřována citlivost a spolehlivost některých metod izolace a identifikace obou virů z orgánů a tkání za různou dobu po infekci. V období prvních sedmi dnů po infekci může být virus PI-3 prokázán imunofluorescencí nebo protilátkami značenými křenovou peroxidázou v otiskových preparátech z výtěrů nosních, v řezech z tracheální a nosní sliznice a plic. Ve srovnání s buněčnými kulturami stabilních linií, derivovaných z hovězích fétů, byly pro izolaci obou virů daleko citlivějším substrátem fetální orgánové kultury. Metoda kultivace přežívajících fragmentů orgánů a sliznic se osvědčila k průkazu viru PI-3 z případů vyšetřených v pozdějším stadiu infekce a z orgánů, kde byl virus v podprahovém množství. Touto metodou byl detekován i virus PI-3 blokováný v orgánech přítomnou protilátkou nebo maskovaný virem IBR. Podobné, i když méně přesvědčivé, byly výsledky pokusů o průkaz viru IBR za sedm a jedenáct dní po infekci. Pro průkaz smíšené infekce oběma viry současně se osvědčila metoda negativního barvení, která umožňuje rozlišení jednotlivých virionů elektronmikroskopicky. Pro stanovení přesnější a spolehlivější virologické diagnózy se jeví komplexní zpracování případů hromadného výskytu respiračního syndromu jako velmi nadějná a perspektivní. orgánová kultura; buněčná kultura; experimentální infekce; diagnostika; imunofluorescence; křenová peroxidáza; negativní barvení

Diagnostika respiračních infekcí telat, založená na přímém průkazu původce onemocnění, není vždy snadná. Ve velkovýrobních podmínkách se stále častěji objevují hromadná onemocnění dýchacího ústrojí, postihující telata od nejútlejšího věku a mladý skot do stáří tři až šest měsíců, která představují spíše komplex než skupinu klinicky a etiologicky samostatných nosologických jednotek (McKercher, 1968). Jen u dvou dosud známých nosologických jednotek můžeme předpokládat, že jejich původcem je jediný virus. Jsou to: infekční bovinní rhinotracheitida (IBR) a bovinní virová diarrhea (BVD). Ostatní dosud známé a popsané syndromy mají komplexní etiologii a na jejich vzniku se podílejí viry, mykoplasmata a bakterie a jejich průběh ovlivňuje ještě celá řada nespecifických faktorů (Menšík aj., 1966, McKercher, 1968, Wizigman n, 1974a,b).

V dřívějších pracích jsme upozornili na častý výskyt viru parainfluenzy 3 (PI-3) u telat stížených akutním respiračním onemocněním ve velkokapacitních teletnicích (Jurmanová a Menšík, 1967, Menšík aj., 1967a,b) a z případů chronických pneumonií jsme izolovali hemaglutinující kmen *Mycoplasma bovirhinis* a prokázali jeho účast při vzniku chronické pneumonie, připomínající enzootickou pneumonii prasat (Menšík aj., 1968, Jurmanová aj., 1970).

Při občasném vplanutí akutního respiračního syndromu u starších telat ve velkokapacitních teletnicích, který často připomínal exacerbaci starších plicních procesů, jsme izolovali několik kmenů viru IBR, jejíž častou frekvenci v chovech skotu v té době se nám nepodařilo potvrdit průkazem protilátek (Menšík a Rozkošný, 1969, Menšík aj., 1970).

Respirační infekce mají ve velkovýrobních podmínkách stoupající tendenci, protože technologie odchovu telat a obrat stáda, vyžadující stále přesuny zvířat, nijak neusnadňují jejich prevenci a tlumení. Také etiologická diagnostika se stává stále složitější, jednak proto, že soubor zárodků v dýchacích cestách je velmi variabilní, jednak proto, že pasivně přejaté a aktivně vytvořené protilátky mohou často maskovat probíhající infekci nebo znesnadňovat izolaci a identifikaci viru.

Cílem předkládané práce bylo ověřit komplexní využití některých běžných i novějších metod izolace a identifikace viru PI-3 a IBR, jejichž frekvence je v našich chovech velmi častá, zatímco průkaz jejich etiologické souvislosti s respiračním syndromem je v běžné diagnostické praxi stále obtížnější a celá řada případů respiračních infekcí zůstává etiologicky neobjasněna.

Metodickou základnu pro detekci obou virů jsme si vytvořili, vedle běžně užívaných metod, zařazením techniky orgánových kultur, imuno-fluorescenční a peroxidázové techniky s komplexním vyšetřením infikovaných zvířat.

MATERIÁL A METODY

PŘÍPRAVA A KULTIVACE ORGÁNOVÝCH KULTUR

V podstatě jsme postupovali podle metody Hoorna (1964) a vlastní modifikovaný postup jsme popsali v práci Machatkové aj. (1974).

Orgánové kultury fetální:

Tkáně byly odebírány z osmi- až devítiměsíčních bovinních fétů, které byly důkladně vykrveny.

Explantáty byly připraveny z tracheálních prstenců, kultivovaných buď vcelku nebo jako fragmenty, o délce 5 až 25 mm. Fragmenty nosní sliznice, připravené z nosní přepážky, byly upraveny tak, aby chrupavka nesla na obou stranách 9 až 12 mm² sliznice, explantáty nosních skořep měly průměr celé skořepy a výšku 5 mm. Velikost fragmentů plic, mizních uzlin, sleziny, jater a ledvin se pohybovala mezi 4 až 5 mm³.

Fragmenty byly kultivovány v syntetickém médiu Parker nebo Parker 199 (ÚSOL Praha) bez séra, upraveném 7,5% NaH₂CO₃ na pH 7,2 a doplněním 200 m. j. penicilinu a 200 gama streptomycinu na 1 ml média.

Fragmenty byly uchovávány podle velikosti a druhu tkáně jednotlivě nebo po třech až pěti ve skleněných nebo plastických Petriho miskách o průměru 35 mm, v atmosféře s 5 % CO₂ při teplotě 37 °C.

Denní výměna média zaručovala udržení vhodného pH a odstraňovala část odumřelých buněk. Při dlouhodobé kultivaci byly intervaly mezi výměnami média prodlouženy až na 48 hodin.

Orgánové kultury z vyšetřovaných telat:

Explantáty tkání zvířat použitých k vyšetření byly získány z telat zpracovaných ihned po vykrvení. Velká pozornost byla věnována dekontaminaci tkání přirozeně infikovaných bakteriemi a plísněmi. Z toho důvodu byly nosní skořepky, trachea a plíce odebírány do média obsahujícího 25 gama fungicidinu, 500 m. j. penicilinu a 500 gama streptomycinu v 1 ml a v něm uchovávaly podle stupně předpokládané kontaminace po dobu jedné až tří hodin. Silně kontaminované materiály bylo možno ponechat v médiu až 10 hodin při teplotě 4 °C (Campbell aj., 1969) a potom důkladně opláchnout fyziologickým roztokem. Z takto ošetřených tkání byly připraveny orgánové kultury, které byly kultivovány stejným způsobem jako kultury fetální.

BUNĚČNÉ KULTURY

Primární buněčné kultury z fetálních ledvin a varlat byly připravovány modifikovanou metodou podle Dulbecca (1952) z osmiměsíčních bovinních fétů. Z fetálních orgánů byly také derivovány stabilní linie, jejichž přípravu a vlastnosti popsalí Machatková a Pospíšil (1975). V práci byly použity primární buňky fetálních bovinních ledvin (FBL), stabilní linie derivované z fetální nosní (FBN) a tracheální (FBT) sliznice, z plic (FBP) a stabilní linie MDBK.

DETEKCE A IDENTIFIKACE VIRU INFEKČNÍ BOVINNÍ RHINOTRACHEITIDY A PARAINFLUENZY 3 IMUNOFLUORESCENČNÍ TECHNIKOU

Orgánové kultury a orgány infikovaných zvířat, určené k imunofluorescenčnímu zpracování, byly buďto zmrazeny v tekutém propan-butanu a řezány na kryostatu s následnou acetonovou fixací, nebo byly fixovány v acetonu a zality zkrácenou metodou do parafinu (Pospíšil aj., 1969). Tkáňové kultury a vzorky nosních a tracheálních výtěrů byly po zaschnutí fixovány pět až deset minut v acetonu.

Přítomnost virů IBR a PI-3 byla prokazována přímou imunofluorescenční metodou pomocí konjugátů, které připravuje Bioveta Nitra.

DETEKCE VIRU PI-3 A IBR POMOCÍ PROTILÁTEK ZNAČENÝCH KŘENOVOU PEROXIDÁZOU

Příprava peroxidázových konjugátů a vlastní barvení jsou podrobně popsány v práci Pospíšila a Franze (1974).

NEGATIVNÍ BARVENÍ VIRŮ

Princip metody (Brenner a Horne, 1959) spočívá v tom, že virové partikule, získané lýzou buněk orgánové nebo buněčné kultury, jsou při barvení obklopeny tenkou vrstvou amorfního tmavého materiálu a virus se jeví jako relativně elektronově transparentní. Jako barvicího roztoku se běžně používá 2% kyselina fosfowolframová v destilované vodě; pH roztoku se upravuje na 6,5 až 7,0.

MODEL KOMPLEXNÍHO VIROLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ INFIKOVANÝCH ZVÍŘAT

K pokusům byla použita tři až pět týdnů stará telata z lokalit, ve kterých se v té době neobjevovaly příznaky respiračních infekcí. Po ověření jejich dobrého zdravotního stavu byla telata infikována virem PI-3 (kmen V 92) v dávce 10^7 TCID₅₀ intratracheálně a intranazálně nebo virem IBR (kmen R6) v dávce 10^6 intranazálně. Telata byla porážena za různě dlouhou dobu po infekci a orgány zpracovány pak k dalšímu vyšetření.

Jako přežívající orgánové kultury byly *in vitro* kultivovány fragmenty nosní sliznice, trachee, plic, sleziny, mízních uzlin plicních a mezenterálních.

Ze změněných částí plic i ostatních již uvedených orgánů byly zhotoveny 10% suspenze, ošetřeny antibiotiky (500 jednotek penicilinu a 500 gama streptomycinu na 1 ml suspenze) a v zatavených ampulích skladovány při teplotě -30°C až do dne vyšetření.

Suspenze byly očkovány do Petriho misek s fetálními orgánovými kulturami, dále do zkumavek s dobře narostlými kulturami primárních telecích ledvinových buněk, linie MDBK a linií derivovaných z orgánů telecích fétů.

Všechny orgány byly vyšetřeny bakteriologicky.

Plice, sliznice nosní a tracheální a přežívající orgánové kultury byly vyšetřeny histologicky, imunofluorescenční technikou a technikou využívající křenové peroxidázy. Médium orgánových kultur bylo sklízeno tak, aby z jednotlivých Petriho misek s přežívajícími fragmenty byl za různou dobu od založení kultury odebrán průměrný vzorek. Virus v médiu byl pak prokazován očkováním na buněčné kultury.

VÝSLEDKY

VYŠETŘENÍ TELAT INFIKOVANÝCH VIREM PI-3

Komplexním postupem bylo zpracováno osm telat poražených v různých časových intervalech po experimentální infekci.

PRŮKAZ VIROVÉHO ANTIGENU V ORGÁNECH A NOSNÍCH VÝTĚRECH (tab. I)

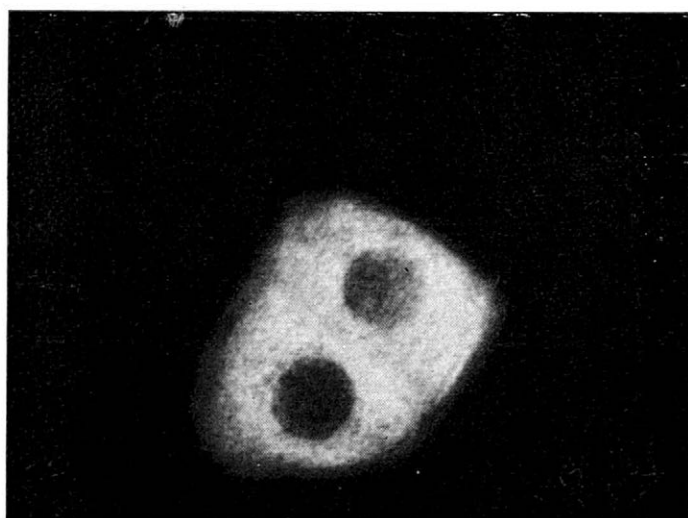
Virový antigen byl imunofluorescencí a protilátkami značenými křenovou peroxidázou prokazován v buňkách nosních výtěrů od třetího do šestého dne po infekci (obr. 1), v řezech nosní a tracheální sliznice se střídavým úspěchem za tři, čtyři a sedm dní (obr. 2) a v plicích od třetího do sedmého dne *p. i.*

I. Průkaz viru PI-3 imunofluorescencí a metodou křenové peroxidázy v nosních výtěrech a orgánech experimentálně infikovaných telat

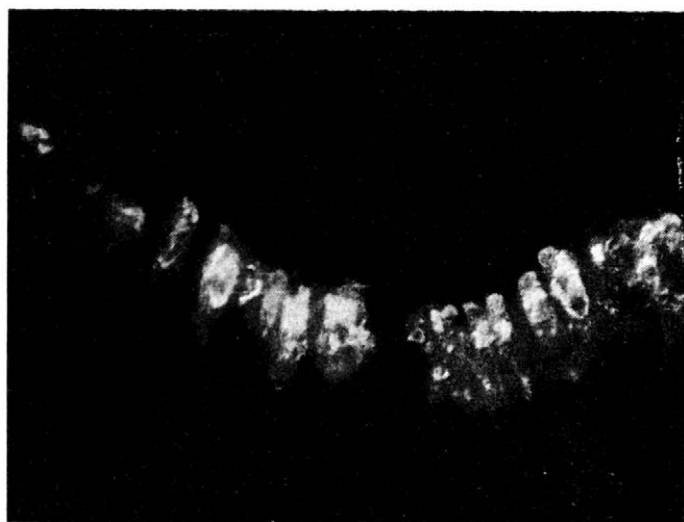
Tele č.	Dny po infekci	Průkaz antigenu: IF/PO			
		nosní výtěr	nosní sliznice	tracheální sliznice	plíce
1	1	O/O	O/O	O/O	O/O
2	2	O/O	NT	NT	NT
	3	+/+	O/O	+/+	+/+
3	3	+/NT	+/NT	+/NT	+/NT
4	3	+/+	NT	NT	NT
	4	+/+	+/+	O/O	+/+
5	6	NT	O/NT	O/NT	+/NT
6	4	+/+	NT	NT	NT
	5	+/+	NT	NT	NT
	6	+/+	NT	NT	NT
	7	NT	O/NT	O/NT	+/NT
7	7	NT	+/+	O/O	+/+

+ — pozitivní nález
O — negativní nález
NT — netestováno

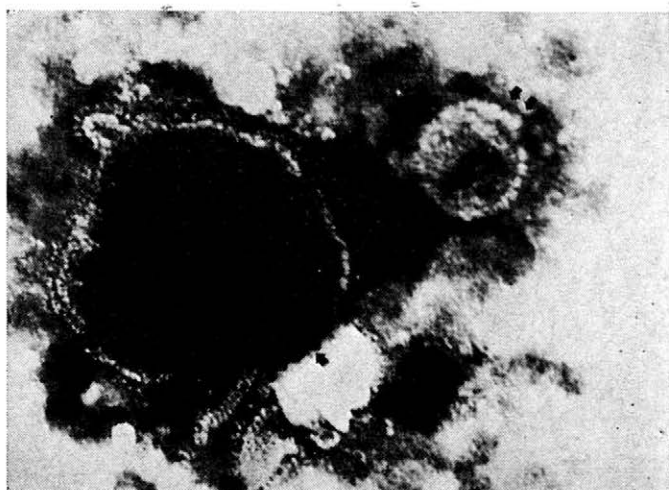
IF — imunofluorescence
PO — metoda křenové peroxidázy



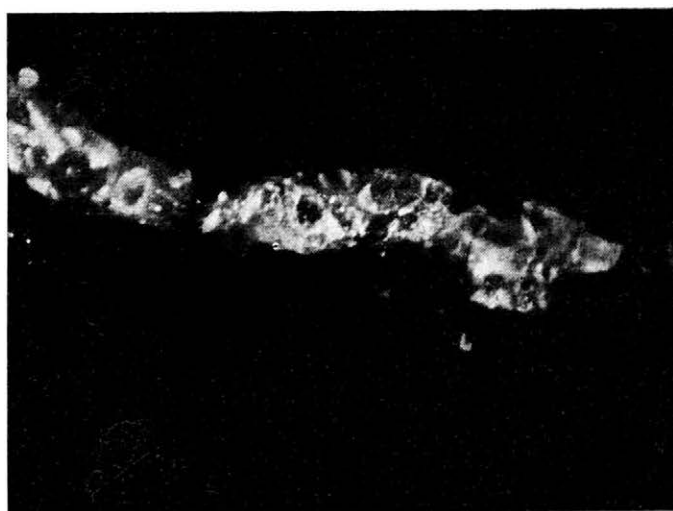
1. Specifická fluorescence v buňkách nosního výtěru telete za čtyři dny po infekci virem PI-3. Zvětšeno 360X



2. Specifická fluorescence buněk tracheální sliznice telete za tři dny po infekci virem PI-3. Zvětšeno 188X



3. Virus PI-3 (šipka) a nukleokapsida viru (IBR) (dvě šipky); smíšená infekce orgánové kultury telecí trachey. Zvětšeno 220 000 X



4. Specifická fluorescence v epiteliálních buňkách přežívající orgánové kultury trachey z telete č. 4 za pět dnů kultivace. Zvětšeno 188 X

PRIMOIZOLACE VIRU

Ke srovnání tradiční techniky, tj. očkování 10% suspenze orgánů na buněčné kultury, s očkováním na fetální orgánové kultury byly zpracovány suspenze plic dvou telat usmrcených za jeden a čtyři dny po infekci (tab. II).

II. Srovnání citlivosti orgánových a buněčných kultur k izolaci viru PI-3 z plic

Tele č.	Dny p. i.	Ředění 10% susp.	Průkaz viru/dny p. i.							
			CPE v buněčných kulturách					izolace z média orgánových kultur		
			FBL	FBP	FBN	FBT	MDBK	FBT	FBP	FBN
1	1	neředěno	+/5	+/6	+/7	+/6	+/6	+/6-14	+/8-14	+/6-13
		10 ⁻¹	+/5	—	—	+/8	+/6	+/8-13	+/9-13	+/9-13
		10 ⁻²	+/7	—	—	—	—	+/8-13	+/9	+/8-13
		10 ⁻³	—	—	—	—	—	+/19-20	+/14	+/13
		neředěno	+/4	+/4	+/4	+/4	+/4	+/5-8	+/6-10	+/5-10
4	4	10 ⁻¹	+/6	+/6	+/5	+/5	+/5	+/5-8	+/6-10	+/5-10
		10 ⁻²	—	—	—	—	+/6	+/6-8	+/8-10	+/8-10
		10 ⁻³	—	—	—	—	—	+/6-8	+/9	+/10
		10 ⁻⁴	—	—	—	—	—	+/6-8	+/10	—
		10 ⁻⁵	—	—	—	—	—	+/7-8	—	—
		10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	+/7-8	—	—

Vysvětlivky: FBL — fetální bovinní ledviny
 FBP — fetální bovinní plíce
 FBN — fetální bovinní nosní sliznice
 FBT — fetální bovinní tracheální sliznice
 MDBK — stabilní linie

Pro reizolaci viru se ukázaly být relativně citlivější primární ledvinové buňky a ze stabilních linií linie MDBK. Daleko nejcitlivějším substrátem však byly fetální orgánové kultury, které produkovaly virus do média různě dlouhou dobu a umožnily jeho snadnější identifikaci buď přímo v buňkách fragmentů imunofluorescencí nebo očkováním média. Virus se začal vylučovat v detekovatelném množství z fragmentů trachee do média, v závislosti na ředění inokula, za pět až osm dní po infekci a byl prokazován po několik dní. Podprahová množství viru z vyšších ředění suspenze mohla být prokázána v médiu v některých případech teprve za 9, 10, 13 a dokonce za 19 dní po infekci.

Možnost detekce viru z orgánové suspenze, v níž jsou podprahová množství viru na buněčných kulturách neprokazatelná, stoupá s dobou životnosti orgánové kultury.

PREZIVAJÍCÍ FRAGMENTY ORGÁNU INFIKOVANÝCH ZVÍŘAT

V orgánových kulturách založených z tkání horních cest dýchacích a plic byl virus PI-3 prokázán i v těch případech, v nichž byly pokusy o jeho izolaci z orgánových suspenzí na buněčných kulturách obtížné

nebo zcela negativní (tab. III). Virus byl spolehlivě detekován v buňkách fragmentů imunofluorescencí nebo peroxidázovým testem a v médiu očkovaním na buněčnou kulturu.

Pokusy o izolaci viru PI-3 z tracheálních sliznic sedmi pokusných telat na buněčných kulturách byl jen ve dvou případech (u telat č. 3

III. Imunofluorescenční průkaz viru PI-3 v přežívajících fragmentech a průkaz

Tele		Titr HI protilátky	Trachea		
č.	poražené za dny p. i.		IF	médium	izolace na FBL
1	1	64	+	+	
			(3-7)	(3-19)	
2	3	1024	+	+	PI-3
			(3-5)	(3-13)	IBR
3	3	32	+	+	PI-3
			(4)	(2-8)	
4	4	512	+	+	-
			(3-6)	(2-8)	IBR
5	6	2048	+	+	-
			(2)	(6-13)	
6	7	2048	NT	-	-
				(4-15)	
7	7	256	NT K	NT K	PI-3

Vysvětlivky: IF imunofluorescenční průkaz viru ve fragmentu NT netestováno
Médium průkaz viru v médiu K kontaminace
FBL fetální bovinní ledviny

a 7) jednoznačně pozitivní. U telat č. 2 a 4 (poražených za tři až čtyři dny po infekci) se z tracheálních sliznic na buněčných kulturách pomnožil virus, jehož cytopatický efekt připomínal virus IBR. Vyšetření infikované buněčné suspenze metodou negativního barvení prokázalo, že se u telete č. 2 jedná o smíšenou kulturu herpesviru a paramyxoviru (obr. 3), zatímco izolát z telete č. 4 byla čistá kultura herpesviru. Naproti tomu byl v přežívajících fragmentech tracheální sliznice pěti ze šesti testovaných telat prokázán virus PI-3 imunofluorescenčním a peroxidázovým testem za dva až sedm dní po založení kultur (obr. 4) a z média byl izolován v časovém rozmezí 2 až 19 dní po založení.

Poměrně nejspolehlivější byl průkaz viru PI-3 na buněčných kulturách z plic (čtyři pozitivní výsledky ze sedmi vyšetření). Přežívající fragmenty plic umožnily však detekci viru v šesti případech ze šesti hodnotitelných. Obdobné výsledky (tři pozitivní ze sedmi testovaných na buněčných kulturách a šest pozitivních ze šesti testovaných přežívajících fragmentů) byly získány při vyšetření nosních sliznic.

Relativně nízký počet pozitivních výsledků na buněčných kulturách odpovídá vysokým hladinám protilátek proti viru PI-3 u vyšetřovaných telat (tab. III).

izolací na buněčných kulturách

Plíce			Nos		
IF	médium	izolace na FBL	IF	médium	izolace na FBL
+	+	PI-3	+	+	—
(3-7)	(3-19)		(7)	(3-19)	
+	+		+	+	—
(3-7)	(5-13)		(3-5)	(5-13)	
+	+	PI-3	+	+	PI-3
(4-5)	(2-11)		(4-5)	(2-14)	
+	+		+	+	—
(3-6)	(2-8)		(3-6)	(2-6)	
+	+		+	+	—
(2-3)	(6-13)		(2-9)	(6-13)	
	+			+	
NT	(15)	PI-3	NT	(15)	PI-3
NT K	NT K	PI-3	NT K	NT K	PI-3

+ pozitivní nález
 (2) (dny po založení kultury)
 — negativní nález

VYŠETŘENÍ TELAT INFIKOVANÝCH VIREM IBR

Obdobným způsobem jsme zpracovali orgány tří telat infikovaných virem IBR a usmrčených za 3, 7 a 11 dní po infekci (tab. IV).

Fetální orgánové kultury, připravené z tracheálních prstenců, nosní sliznice, vaginální sliznice a plic, jsou vnímavé i k infekci virem IBR a mohou být použity k jeho průkazu v orgánech telat i v pozdějším stadiu onemocnění (11 dní *p. i.*), kdy je již izolace na buněčných kulturách nejistá. Stejně citlivé jako buněčné kultury se fetální orgánové kultury ukázaly při pokusech o izolaci viru z telat usmrčených za tři a sedm dní po infekci. Z buněčných kultur se vedle primárních buněk (FBL) osvědčila i stabilní linie derivovaná z fetální nosní sliznice.

Přežívající fragmenty nosní a tracheální sliznice a plic z telat poražených za tři a sedm dní *p. i.* produkovaly virus nepravidelně do média v období dva až šest dní po založení. U telete poraženého za sedm dnů po infekci byl virus prokázán z přežívajícího fragmentu vaginy za devět až jedenáct dnů po založení a z fragmentu mízní uzliny plicní za jedenáct až čtrnáct dnů po založení. Průkaz viru v orgánech telete č. 13,

IV. Průkaz viru IBR v orgánech infikovaných telat

Tele č.	Dny p. i.	Orgán	Výsledky izolace				
			buněčné kultury		orgánové kultury fetální		orgánové kultury z telat
			FBL	FBN			
11	3	trachea	+	+	trachea +(2)	nos +(4)	+(3-6)
		pľíce	+	+	+(4-5)	-(6)	+(3,4)
		nos	+	+	+(2)	+(4)	+(2,3)
		spojivka	-	-	+(3)	-(6)	+(4)
		tonsila	+	+	+	+	NT
		slezina	-	-	-	-	NT
12	7	trachea	+	+	trachea +(4-5)	vagina NT	+(6)
		pľíce	+	+	+(5)	-	+(2)
		nos	+	+	+(3-6)	+(3)	+(2,4)
		vagina	-	-	+(5)	+(4)	+(9-11)
		mízní uzliny plicní	+	+	NT	NT	+(11-14)
13	11	trachea	-	-	trachea +(2-4)	pľíce +(1)	-(3-12)
		pľíce	-	-	-	+(1)	-(3-12)
		nos	+	+	-	+(2)	-(3-12)
		spojivka	+	+	+(8)	+(6)	-(3-12)
		mízní uzliny plicní	+	+	-	+(2)	+(7)

Vysvětlivky: FBL fetální bovinní ledviny
 NT netestováno
 FBN fetální bovinní nosní sliznice

poraženého za jedenáct dní p. i., se v přežívajících fragmentech tkání respiračního traktu nezdařil s výjimkou mízní uzliny plicní. Tyto výsledky odpovídají multiplikačním vlastnostem viru a způsobu jeho šíření v organismu telat po infekci respiračního traktu.

DISKUSE

Výsledky práce poukazují na možnost praktického využití stabilních buněčných linií z tkání bovinních fětů (Machatková a Pospíšil, 1975) a orgánových kultur připravených z tkání respiračního traktu (Machatková aj., 1974) a jiných orgánů v diagnostice infekcí vyvolaných virem IBR a PI-3.

Buněčné kultury derivované z epitelů, které jsou i v přirozených podmínkách predilekčními místy pro multiplikaci obou virů, představují svými dobrými růstovými vlastnostmi, nenáročností, spolehlivostí a citlivostí velmi dobrý buněčný substrát, vhodný především pro přímý důkaz a identifikaci viru IBR. V tomto směru odpovídají naše výsledky poznatkům jiných autorů (Snowdon, 1965, Shroyer a Easterday, 1968, York, 1968). Ve srovnání s virem IBR se virus PI-3 množí v daleko menším spektru buněčných kultur. Nejlépe se nám, podobně jako jiným autorům, osvědčily primární buňky fetálních ledvin skotu a stabilní linie MDBK (Woods, 1968, McKercher aj., 1972, Kita a Gillespie, 1968).

Standardizací metod kultivace tkáňových fragmentů z bovinních fétů byl získán další velmi vhodný substrát k pomnožování viru IBR a PI-3 (Machatková aj., 1974, Shroyer a Easterday, 1968). Fetální orgánové kultury plic, tracheální a nosní sliznice jsou ve srovnání se všemi buněčnými kulturami pro izolaci viru PI-3 nejcitlivější a spolehlivost detekce a identifikace viru se zvyšuje jejich dlouhou životností. V našich explantátech jsme nepozorovali pokles nebo vymizení ciliární aktivity, jaké popsali Campbell aj. (1969), ani jsme nezaznamenali výraznější rozdíly v enzymatické aktivitě buněk v explantátech infikovaných a kontrolních (Machatková aj., 1974).

Fetální orgánové kultury se ukázaly být velmi citlivým systémem také pro izolaci viru IBR. Ten byl prokázán i v orgánech, u nichž pokusy o izolaci na buněčné kultuře byly negativní (tab. IV).

Vysokou vnímavost orgánových kultur ve srovnání s buněčnými kulturami je možno vysvětlit tím, že zatímco v buněčných kulturách ztrácejí buňky schopnost strukturální závislosti, jsou buňky v orgánových kulturách svými vlastnostmi bližší makroorganismu, protože si uchovávají původní intercelulární vztahy. Tkáňová citlivost k virové infekci závisí na stupni diferenciaci a funkční závislosti buněk ve tkáni (Laier, 1970). Existující korelaci mezi multiplikací viru a životností buněk v orgánové kultuře prokázal již Frenkel aj. (1955) a později Tyrrell a Blamire (1967).

Výsledky, které nám poskytla modelová infekce telat virem PI-3 i virem IBR, naznačují možnost perspektivního využití orgánových kultur v diagnostice obou virů, popřípadě i dalších respiračních virů, v praxi veterinárních diagnostických ústavů.

Fetální orgánové kultury považují za vhodný systém pro izolaci virů také Reed aj. (1971), Harnett a Hooper (1968), Votava a Tyrrell (1970), McIntosh aj. (1967), Higgins aj. (1969). Schaaff aj. (1971) izolovali na orgánových kulturách dva kmeny enterovirů, jeden picornavirus a jeden myxovirus z materiálů, které na buněčných kulturách byly negativní. Také Roome aj. (1971) izolovali na orgánových kulturách vyšší počet myxovirů, paramyxovirů, picornavirů, adenovirů a herpesvirů.

Pro naše výsledky je zvláště důležitý údaj Votavy a Tyrrella (1970), kteří považují orgánové kultury za 100X citlivější než kultury buněčné jen pro důkaz rhinovirů skotu; u ostatních respiračních virů nezaznamenali významné rozdíly.

Pro využití bovinních fetálních orgánových kultur k izolaci respiračních virů skotu je nesporně výhodná ta okolnost, že fety mohou být odebrány v různých obdobích intrauterinního vývoje a orgánové kultury z nich představují dostatečně diferencovanou homologní tkáň, na níž se virus může množit bez předchozí adaptace.

Citlivost fetální orgánové kultury pro izolaci viru PI-3 zvyšuje schopnost dlouhodobé kultivace orgánových fragmentů, která umožňuje adsorbci malých množství viru ze suspenze, popřípadě i adsorbci a později i pomnožení viru částečně blokováného protilátkou.

Předpokládáme, že stejně jako v našich pokusech je i v praxi řada negativních výsledků na buněčných kulturách způsobena přítomností protilátek v orgánové suspenzi. Pravidelnou každodenní výměnou média se po několika dnech zbytky protilátky z orgánové kultury odstraní a pomnožený virus, vylučovaný do média, může být pak snadno izolován. Tyto nesporné přednosti orgánových kultur se zvláště výrazně projeví při využití metody, kterou jsme nazvali „metoda přežívajících orgánových fragmentů“ z infikovaných telat. S výjimkou tracheální kultury telete usmrceného za sedm dní po infekci a kultur, které nemohly být zhodnoceny pro kontaminaci, byl virus PI-3 identifikován v buňkách fragmentů nebo v médiu všech infikovaných a poražených telat, zatímco pokusy o izolaci na buněčných kulturách vyzněly ve 12 případech z 21 testovaného negativně.

Ať již byla příčinou negativních výsledků na buněčných kulturách interkurentní infekce virem IBR (tele č. 2 a 4), nebo vysoký titr protilátek u telat č. 2, 4, 5, nebo malé množství viru v počátečních stadiích infekce (tele č. 1), vykazoval virus také v přežívajících fragmentech některých telat velmi dobrou multiplikační schopnost (od 3 do 13 až 19 dní po založení kultury).

Zvláště zajímavé jsou výsledky kultivace fragmentů telete č. 6. Virus se v nich začal vylučovat do média orgánové kultury plic a nosní sliznice teprve 15. den po založení. Lze tedy předpokládat, že i latentní nebo perzistující virus po proběhlé infekci, blokový *in vivo* cirkulujícími nebo sekrečními protilátkami, může být po dlouhodobé kultivaci orgánových fragmentů detekován.

Úspěšný průkaz viru IBR v přežívajících orgánových fragmentech závisí na době, která uplynula od začátku multiplikačního cyklu viru na jednotlivých sliznicích do porážky zvířete. Ukazuje se totiž, že virus, který svůj multiplikační cyklus na sliznici *in vivo* započal, na přežívající sliznici *in vitro* jej pouze dokončuje (R o z k o š n ý aj., 1973).

Tento princip vysvětluje také opožděný výskyt viru v přežívajících fragmentech spojivky a vagíny telat, tedy na sliznicích, které *in vivo* představují místa sekundární virové multiplikace.

Virus IBR se tedy v přežívající orgánové kultuře chová zcela jinak než virus PI-3, což souvisí pravděpodobně s jiným lokálním mechanismem obrany proti infekci.

Z metod usnadňujících izolaci viru PI-3 a IBR mají praktický význam zvláště ty, které urychlují jejich identifikaci. Jsou to metody průkazu virového antigenu imunofluorescenční a peroxidázovou technikou v buňkách buněčných a orgánových kultur. Obě metody jsou zvláště účinné při detekci antigenu v buňkách nosních sekretů, v epiteliálních buňkách

trachee a bronchů a v plicních alveolárních buňkách poražených zvířat. Jejich úspěch je však zaručen jen v případě, kdy je vyšetření provedeno ve vhodné době po infekci nebo vzplanutí onemocnění, a předpokládá dostatečné množství detekovatelného virového antigenu.

Literatura

- BRENNER, S. — HORNE, R. W.: A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem. biophys. Acta*, 34, 1959, s. 103-110.
- CAMPBELL, R. S. F. — THOMPSON, H. — LEIGHTON, E. — PENNY, W.: Pathogenesis of bovine parainfluenza 3 virus infection in organ cultures. *J. comp. Path.*, 79, 1969, s. 347-354.
- DULBECCO, R.: Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.*, 38, 1952, s. 747-752.
- FRENKEL, S. — VAN BEKKUM, J. G. — FRENKEL, H. S.: La culture du virus de la peste porcine dans le tissu splénique du porc, explanté en milieu liquide. *Bull. Off. int. Épidémiol.*, 43, 1955, s. 323-326.
- HARNETT, G. B. — HOOPER, W. L.: Test-tube organ cultures of ciliated epithelium for isolation of respiratory viruses. *Lancet*, I, 1968, s. 339-340.
- HIGGINS, P. G. — EILIS, M. E. — WOOLLEY, D. A.: A comparative study of standard methods and organ culture for the isolation of respiratory viruses. *J. med. Microbiol.*, 2, 1969, s. 109-115.
- HOORN, B.: Respiratory viruses in model experiments. *Transaction of the 15th Congress of the Scandinavian Oto-laryngological Society, Stockholm 1963. Acta oto-laryng.*, Suppl. 188, 1964, s. 138-144.
- JURMANOVÁ, K. — MENŠÍK, J.: Demonstration of parainfluenza 3 virus in cattle in Czechoslovakia. *Acta virol.*, Praha, 11, 1967, s. 164-169.
- JURMANOVÁ, K. — KUŽEL, M. — MENŠÍK, J.: Účast mykoplazmat při vzniku chronického respiračního syndromu u telat a mladého skotu. III. Frekvence mykoplazmat ve velkokapacitním teletniku s kontinuálním provozem. *Docum. vet.*, Brno, 1970 (v tisku).
- KITA, J. — GILLESPIE, J. H.: Susceptibility of various types of cell cultures to three strains of bovine parainfluenza 3 virus. *Cornell Vet.*, 58, 1968, s. 218-222.
- LAIER, H. R.: Organ cultures in evaluation of antiviral drugs. I. Virus infection in trachea explants as potential model systems for evaluation of antiviral drugs against respiratory viruses. *Arch. ges. Virusforsch.*, 30, 1970, s. 379-396.
- MACHATKOVÁ, M. — POSPÍŠIL, Z. — MENŠÍK, J.: Kultivace orgánových kultur připravených z respiračního traktu telat. *Vet. Med. (Praha)*, 19, 1974, č. 9, s. 565-570.
- MACHATKOVÁ, M. — POSPÍŠIL, Z.: Biologic characteristics of cell lines derived from the respiratory tract of a bovine foetus. *Folia Biol.*, Praha, 1975 (in press).
- McINTOSH, K. — DEES, J. H. — BECKER, W. B. — KAPIKIAN, A. Z. — CHANOCK, R. M.: Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.*, 57, 1967, s. 933-940.
- McKERCHER, D. G.: Bovine respiratory infections. *J. Am. vet. med. Ass.*, 152, 1968, s. 729-733.
- McKERCHER, D. G. — SAITO, J. K. — FRANTI, C. E. — WADA, E. M. — CRENSHAW, G. L.: Response of calves to parainfluenza 3 vaccines administered nasally or parenterally. *Am. J. vet. Res.*, 33, 1972, s. 721-730.
- MENŠÍK, J. — ROZKOŠNÝ, V.: Průkaz viru IBR v souvislosti s akutním respiračním onemocněním telat a mladého skotu. *Vet. Med. (Praha)*, 14, 1969, č. 12, s. 653-664.
- MENŠÍK, J. — JURMANOVÁ, K. — PLEVA, V. — ČERNÁ, J. — KOČÍ, J.: Izolace a identifikace virových agens zúčastněných na respiračních infekcích skotu v ČSSR. Účast viru Parainfluenzae 3 na respiračních infekcích telat ve velkokapacitních odchovných zařízeních. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, 1966, 186 s.

- MENŠÍK, J. — JURMANOVÁ, K. — KOCÍ, J.: Účast viru PI-3 při respiračních infekcích skotu ve velkokapacitních odchovných zařízeních. I. Vznik a průběh nákazy po přirozené infekci a frekvence viru u telat 1–8 týdnů starých. *Vet. Med. (Praha)*, 12, 1967a, č. 6, s. 293–302.
- MENŠÍK, J. — JURMANOVÁ, K. — PLEVA, V. — VALÍČEK, L. — ŠMÍD, B.: Příspěvek k virologické diagnostice respiračních infekcí skotu. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1967b. 52 s.
- MENŠÍK, J. — VALÍČEK, L. — ČERNÁ, J.: Klinický a patohistologický obraz experimentální infekce telat Myxovirem parainfluenzae 3. *Vet. Med. (Praha)*, 13, 1968, č. 5, s. 259–263.
- MENŠÍK, J. — ROZKOŠNÝ, V. — MESÁROŠ, E. — KREJČÍ, J. — POSPÍŠIL, Z. — VALÍČEK, L. — JURMANOVÁ, K. — FRANZ, J. — HÁJKOVÁ, M. — PLEVA, V.: Výzkum etiologie, diagnostiky a prevence virových respiračních a střevních infekcí skotu. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1970. 120 s.
- POSPÍŠIL, Z. — FRANZ, J.: Využití protilátek značených křenuvou peroxidázou k průkazu antigenů. *Vet. Med. (Praha)*, 19, 1974, č. 8, s. 499–504.
- POSPÍŠIL, Z. — MESÁROŠ, E. — ŠTĚPÁNEK, J.: Diagnostika virové gastroenteritidy prasat z histologických řezů pomocí imunofluorescenční metody. *Vet. Med. (Praha)*, 14, 1969, č. 6, s. 351–356.
- REED, D. E. — BICKNELL, E. J. — LARSON, C. A. — KNUDTSON, W. U. — KIRKBRIDE, C. A.: Infectious bovine rhinotracheitis virus-induced abortion: Rapid diagnosis by fluorescent antibody technique. *Vet. Res.*, 32, 1971, s. 1423–1429.
- ROOME, A. P. C. H. — DICKINSON, V. — CAUL, E. O.: Simplified organ cultures of human embryo trachea in the diagnosis of viral respiratory disease of children. *J. clin. Path.*, 24, 1971, s. 487–490.
- ROZKOŠNÝ, V. — POSPÍŠIL, Z. — MENŠÍK, J. — MACHATKOVÁ, M. — ČEPIKA, A. — SUCHÁNKOVÁ, A.: Patogeneze infekční bovinní rhinotracheitidy (IBR) a parainfluenzové infekce (PI-3) skotu. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1973. 53 s.
- SCHAAFF, D. M. — BOSWELL, J. — MUFSON, M. A.: Viral and mycoplasmal infection in minor respiratory illnesses and nonstreptococcal pharyngitis. A search for coronaviruses using fetal trachea organ cultures. *Am. Rev. resp. Dis.*, 104, 1971, s. 41–51.
- SHROYER, E. L. — EASTERDAY, B. C.: Growth of infectious bovine rhinotracheitis virus in organ cultures. *Am. J. vet. Res.*, 29, 1968, s. 1355–1362.
- SNOWDOWN, W. A.: The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust. vet. J.*, 41, 1965, s. 135–142.
- TYRRELL, D. A. J. — BLAMIRE, C. J.: Improvements in a method of growing respiratory viruses in organ cultures. *Br. J. exp. Path.*, 48, 1967, s. 217–227.
- VOTAVA, M. — TYRRELL, D. A. J.: The possible value of certain cells for the propagation of respiratory viruses. *Arch. ges. Virusforsch.*, 29, 1970, s. 253–256.
- WIZIGMANN, G.: Untersuchungen über Epidemiologie und Ätiologie der Rinderrippe. I. Vorkommen und Verbreitung von bovinen Adenoviren, Rhinoviren, Reoviren und Parainfluenza 3-Virus. *Zentbl. VetMed. B*, 21, 1974a, s. 563–579.
- WIZIGMANN, G.: Untersuchungen über Epidemiologie und Ätiologie der Rinderrippe. II. Mitbeteiligung von bovinen Adenoviren, Rhinoviren, Reoviren und Parainfluenza 3-Virus bei Rinderrippe-Erkrankungen. *Zentbl. VetMed.*, B, 21, 1974b, s. 580–591.
- WOODS, G. T.: The natural history of bovine Myxovirus parainfluenza 3. *J. Am. vet. med. Ass.*, 152, 1968, s. 771–781.
- YORK, C. J.: Infectious bovine rhinotracheitis. *J. Am. vet. med. Ass.*, 152, 1968, s. 758–762.

Došlo dne 12. 6. 1975

МЕНЬШИК Я., ПОСПИШИЛ З., СУХАНКОВА А., ЧЕПИЦА А., РОЗКОШНЫ В., ШМИД Б., МАХАТКОВА М. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Применение комплексной вирусологической техники для прямого доказательства вирусов PI-3 и IBR в органах зараженных телят. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) 609-622, 1975.

Путем комплексной обработки семи телят, экспериментально зараженных вирусом PI-3, и трех телят, зараженных вирусом IBR, проверялась чувствительность и надежность некоторых методов изоляции и идентификации обоих вирусов из органов и ткани в разное время после инфекции. В период первых семи дней после инфекции может быть вирус PI-3 доказан иммунофлуоресценцией или антителами, мечеными хреновой пероксидазой в печатных препаратах из носовых мазков, в срезах из трахеальной и носовой слизистой оболочки и легких. По сравнению с клеточными культурами стабильных линий, полученных из говяжьих фетов, для изоляции обоих вирусов были более чувствительным субстратом фетальные оргкультуры. Метод культивации переживших фрагментов органов и слизистой оболочки оправдал себя при доказательстве вируса PI-3 в случаях, обследованных в более поздних стадиях инфекции, и в органах, где вирус находился в подпороговом количестве. При помощи этого метода был детектирован также вирус PI-3, блокируемый в органах наличным антителом или маскируемый вирусом IBR. Аналогичны, хотя и мало убедительны, были результаты опытов о доказательстве вируса IBR спустя 7—11 дней после инфекции. Для доказательства смешанной инфекции обоими вирусами одновременно оправдал себя метод отрицательной окраски, который позволяет отличить отдельные вирионы электронномикроскопически. Для определения более точного и более надежного вирусологического диагноза комплексная обработка случаев массового появления респираторного синдрома является весьма надежной и перспективной.

органный культуру; клеточная культуру; экспериментальная инфекция; диагностика; иммунофлуоресценция; хреновая пероксидаза; отрицательная окраска

MENŠÍK J., POSPÍŠIL Z., SUCHÁNKOVÁ A., ČEPICA A., ROZKOŠNÝ V., ŠMÍD B., MACHATKOVÁ M. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). *The Use of Complex Virological Technique for a Direct Demonstration of the PI-3 and IBR Viruses in the Organs of Infected Calves.* Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) :609-622, 1975.

Seven calves experimentally infected with the PI-3 virus and three calves infected with the IBR virus were subjected to complex tests in order to check the sensitivity and reliability of some methods of the isolation and identification of both viruses from organs and tissues in different intervals after infection. In the period of the first seven days after infection, the PI-3 virus can be demonstrated by immunofluorescence or by antibodies marked with horse-radish peroxidase in the touch preparations from the nasal smears, in the sections of the tracheal and nasal mucous membrane, and lungs. In comparison with the cell cultures of established lines derived from bovine foetuses, much higher sensitivity for the isolation of both viruses was found in the foetal organ cultures. The method of the cultivation of the surviving fragments of organs and mucous membranes was found suitable for the demonstration of the PI-3 virus from cases examined at a later stage of infection and from organs in which the virus was present in a below-threshold quantity. This method was also successfully applied to the detection of the PI-3 virus blocked by an antibody present in the organ or masked by the IBR virus. Similar results (though less convincing) were obtained in the trials to demonstrate the IBR virus seven and eleven days after infection. The method of negative staining which enabled an electron-microscopic separation of individual virions proved suitable for the demonstration of a mixed infection with both viruses at the same time. The complex examination of the cases of a mass occurrence of the respiration syndrome was found promising for the determination of a more accurate and reliable virological diagnosis.

organ culture; cell culture; experimental infection; diagnosis; immunofluorescence; horse-radish peroxidase; negative staining

MENŠÍK J., POSPÍŠIL Z., SUCHÁNKOVÁ A., ČEPICA A., ROZKOŠNÝ V., ŠMÍD B., MACHATKOVÁ M. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Ausnutzung der komplexen virologischen Technik zum direkten Nachweis der PI-3 und IBR-Viren in Organen infizierter Kälber*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 609-622, 1975.

Durch komplexe Bearbeitung von sieben mit dem PI-3-Virus experimentell und drei mit dem IBR-Virus infizierten Kälbern wurde die Sensibilität und Verlässlichkeit einiger Methoden zur Isolierung und Identifizierung **beider Viren aus Organen** und Geweben in unterschiedlicher Zeit nach der Infektion überprüft. In der Periode der ersten sieben Tage nach der Infektion kann das PI-3-Virus mit Hilfe des Immunfluoreszenztestes oder mit den mit der Krenperoxydase markierten Antikörpern in Abdruckpräparaten aus Nasenausstrichen und in trachealen und Nasenschleimhaut- und Lungenschnitten nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den aus Rinderfeten derivierten Zellkulturen stabiler Linien erwiesen sich zur Isolierung der beiden Viren als weitaus sensitiveres Substrat die Fetusorgankulturen. Die Methode der Kultivierung überlebender Organ- und Schleimhautfragmente bewährte sich zum Nachweis des PI-3-Virus bei im späteren Infektionsstadium untersuchten Fällen und aus Organen, in denen das Virus in Unterschwellenwert-Mengen festgestellt wurde. Mit Hilfe dieser Methode wurde auch das in den Organen durch anwesende Antikörper blockierte oder vom IBR-Virus verdeckte PI-3-Virus nachgewiesen. Ähnlich, wenn auch weniger überzeugend waren die Versuchsergebnisse und der IBR-Virusnachweis in sieben und elf Tagen nach der Infektion. Zum Nachweis einer gemischten Infektion mit beiden Viren gleichzeitig bewährte sich die Methode der negative Färbung, die eine elektronenmikroskopische Unterscheidung der einzelnen Virionen ermöglicht. Für eine genauere und verlässlichere virologische Diagnose ist die komplexe Bearbeitung von Fällen eines massenweisen Auftretens des Respirationssyndroms sehr perspektiv.

Organkultur; Zellkultur; experimentelle Infektion; Diagnostik; Immunofluoreszenz; Krenperoxydase; negative Färbung

Adresa autorů:

Doc. MVDr. J. Menšík, CSc., MVDr. Z. Pospíšil, CSc., RNDr. A. Suchánková, MVDr. A. Čepica, MVDr. V. Rozkošný, MVDr. B. Šmíd, ing. M. Machatková, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno - Medlánky

VLIV TYLANU NA KULTIVACI BUNĚČNÝCH A ORGÁNOVÝCH KULTUR DERIVOVANÝCH Z TELECÍCH TKÁNÍ

V. Rozkošný, Z. Pospíšil, Z. Vrba

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno
Zenit, Brno

ROZKOŠNÝ V., POSPÍŠIL Z., VRBA Z. Vliv Tylanu na kultivaci buněčných a orgánových kultur derivovaných z telecích tkání. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 623-631, 1975.

Testováním cytotoxicity přípravku Tylan (Tylosin Tartrate Sterile Injectable) na buněčných kulturách embryonálních telecích ledvin bylo zjištěno, že ještě koncentrace 781 μg na 1 ml udržovacího média nevyvolává po dobu dvanáctidenní kultivace změny v buněčném porostu. Ve vyšších koncentracích působí Tylan toxicky. V orgánových kulturách telecích tracheálních explantátů ještě při koncentraci 1562 μg na 1 ml udržovacího média nebyly pozorovány během dvanáctidenní kultivace podstatné změny ve srovnání s kontrolními explantáty. Při vyšších koncentracích byly v epitelu explantátů pozorovány dystrofické změny, jejichž vývoj a intenzita byly závislé na použité koncentraci Tylanu. Testováním cytotoxicity penicilinu (draselná sůl) pro telecí tracheální explantáty byla zjištěna limitující koncentrace 1000 m. j. na 1 ml média.

Tylan; penicilin; cytotoxicita; tracheální explantáty; buněčná kultura

V průběhu téměř třicetileté historie kultivace buněčných kultur a poměrně krátké historie obnovení metodiky orgánových kultur ve virologické praxi dosáhla antibiotická kontrola bakteriálních kontaminací dominujícího postavení před jinými antimikrobiálními látkami. Zatímco počet antibiotik používaných k ochraně buněčných kultur neustále vzrůstá spolu s rozšiřováním spektra účinnosti jednotlivých přípravků (Wigmore a Henderson, 1955, Perlman aj., 1967), existuje poměrně málo údajů sledujících antibiotickou ochranu orgánových kultur před bakteriální a mykoplazmovou infekcí (Hoorn, 1966, Hoorn a Tyrrell, 1969).

V předložené práci jsme se zaměřili na sledování toxicity širokospektrálního antibiotika na tylosinové bázi k epiteliálním buňkám dýchacího traktu se zřetelem k jeho praktickému využití v prevenci respiračních infekcí telat a k eliminaci nežádoucích bakteriální a mykoplazmové infekce ve virologické diagnostické praxi.

MATERIÁL A METODA

ORGÁNOVÉ KULTURY

Tracheální explantáty byly připraveny z osmiměsíčních telecích fétů podle původně popsané metodiky Hoorna (1966), v modifikaci naší laboratoře (Mačatková aj., 1974). Z asepticky odebrané trachee byly nařezány jednotlivé

prstence o síle asi 14 mm, které po trojnásobném promytí ve vlažném fyziologickém roztoku a po rozříznutí v dorzální sponě byly uloženy jednotlivě do Petriho misek se 3 ml média Parker 199 bez séra a antibiotik a kultivovány při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Po 24hodinové kultivaci byly fragmenty rozděleny do skupin nejméně po pěti a pro jednotlivé skupiny byla připravena udržovací média Parker 199 s konečnou koncentrací Tylanu na 1 ml: 25 000 µg, 12 500 µg, 6250 µg, 3120 µg, 781 µg, 395,5 µg a 195,3 µg.

Pro srovnání byla sledována toxicita nejčastěji používaného antibiotika penicilinu v konečných koncentracích 6000, 4000, 2000, 1000, 500 a 200 m. j. na 1 ml udržovacího média Parker 199. V průběhu pokusu byla média pokusných i kontrolních skupin denně vyměňována. Působení antibiotik na explantáty bylo testováno sledováním ciliární aktivity a řasinkového epitelu, stanovením enzymu sukcinátdehydrogenázy a histologicky.

Ciliární aktivita tracheálních explantátů byla sledována inverzním mikroskopem LDM-1 (Meopta Brno) a hodnocena procentuálně z celého povrchu epitelu explantátů (Reed, 1969, Finkelstein aj., 1972).

K průkazu sukcinátdehydrogenázy (SDH) bylo použito původní metodiky (Laier, 1970) založené na schopnosti SDH redukovat tetrazoliové soli na červeně zbarvený formazan, modifikované pro potřeby naší laboratoře (Menšík aj., 1973).

K histologickému vyšetření byly explantáty fixovány v 10% formalinu nebo Bouinově roztoku a zpracovány běžnou parafrínovou technikou. Rezy 4–5 µ silné byly barveny hematoxilin-eosinem.

BUNĚČNÉ KULTURY

Primokultury byly připraveny z ledvin osmiměsíčního telecího fétu podle původní metodiky Dulbecca a Vogta (1954). Jako růstové médium byl použit roztok Hankse s 20 % telecího fetálního séra. Do pokusu byly vybrány pouze kultury, které po pětidenní kultivaci při teplotě 37 °C vytvořily na Leightonových zkumavkách kompletní monolayer buněk. Pro jednotlivé skupiny (vždy nejméně pět zkumavek) byla připravena udržovací média Earle s konečnou koncentrací Tylanu na 1 ml kompletního média: 25 000 µg, 12 500 µg, 6250 µg, 3120 µg, 1562 µg, 781 µg, 390,5 µg a 195,3 µg. Udržovací médium bylo u pokusných i kontrolních skupin denně vyměňováno a buněčné kultury byly denně hodnoceny pod světelným mikroskopem. Kritériem pro hodnocení toxicity Tylanu pro buněčné kultury bylo procento neporušeného monolayeru buněk.

TESTOVANÉ ANTIBIOTIKUM

Tylan (Tylosin Tartrate Sterile Injectable), Elanco Products Limited, Broadway House, The Broadway, London.

VÝSLEDKY

Přehled výsledků působení jednotlivých koncentrací Tylanu na tracheální explantáty, uvedený v tab. I, ukazuje, že poškození řasinkovitého epitelu je vázáno na koncentrace od 25 000 až do 3120 µg Tylanu na 1 dl média. V nižších koncentracích v průběhu dvanáctidenního sledování nebyly zjištěny podstatné rozdíly ve srovnání s kontrolní skupinou.

Ve skupině s koncentrací 25 000 µg bylo již za 24 hodiny po zastavení pokusu pozorováno podstatné snížení ciliární aktivity, které bylo provázeno rozsáhlými dystrofickými změnami buněk, projevujícími se zakulacováním, vakuolizací a vypadáváním buněčných agregátů z epitelu do média. Tomuto stavu odpovídaly i výsledky stanovení SDH, kdy na explantátech této skupiny zůstaly po 24hodinové kultivaci pouze ostrůvky buněk s pozitivní reakcí. V dalších 24 hodinách se dystrofické změny v epitelu rozvinuly do té míry, že u žádného explantátu z této skupiny ne-

I. Cytotoxický účinek Tylanu na telecí tracheální explantáty

Skupina	Dávka v kg	Explan- táty	Dny kultivace											
			2		3		5		7		9		12	
			CA	SDH	CA	SDH	CA	SDH	CA	SDH	CA	SDH	CA	SDH
1	25 000	1	30		0		0							
		2	20	40	0	0	0	N	0	N	N	N	N	N
		3	30		0		0		0					
2	12 500	1	50		20		0		0					
		2	N	N		0	N		N	N	N	N		N
		3	50		30		0	N	0					
3	6 250	1	100				0		0					
		2	80	80	80	N	0	10	0	N	N	N	N	N
		3	90				10		0					
4	3 120	1					60		40		10		10	
		2	80	N	80	80	80	70	40	50	20	30	10	N
		3					40		50		20		10	
5	1 562	1												
		2	80	N	80	N	80	100	80	100	80	90	80	90
		3												
6	781	1												
		2	80	80	80	N	80	N	80	N	80	90	80	N
		3												
7	390	1												
		2	80	N	80	80	80	80	80	N	80	N	80	N
		3												
8	195,3	1												
		2	80	N	80	N	80	N	80	N	80	N	80	N
		3												
9	kon- trolla	1												
		2	80	80	80	100	80	80	80	80	80	90	80	90

N — netestováno

CA — ciliární aktivita

SDH — sukcinátdehydrogenáza

byla zpozorována ani ciliární aktivita, ani kvalita SDH a histologicky byla zaznamenána jen ojedinělá místa se značně degenerovanými buňkami. Obdobný obraz geneze změn byl zjišťován i v druhé skupině s konečnou koncentrací 12 500 μg ylanu na 1 ml média.

V dalších dvou skupinách byl vývoj změn pozvolnější. Při koncentraci 6250 μg na 1 ml média nebyl ještě za 72 hodiny pozorován rozdíl od kontrol, ale v následujících 24 hodinách došlo k rychlému rozvoji změn obdobného charakteru jako u dvou předcházejících skupin. Ve čtvrté sku-

II. Cytotoxický účinek penicilinu na telecí tracheální explantáty

Skupina	Dávka v M. S.	Explan- táty	Dny kultivace											
			2		3		5		7		9		12	
			CA	SDH	CA	SDH	CA	SDH	CA	SDH	CA	SDH	CA	SDH
1	6000	1	80		50		20		0		0		0	
		2	70	80	40	50	20	10	0	0	0	0	0	N
		3	80		50		10		0		0		0	
2	4000	1	80		70		50		5		0		0	
		2	80	N	60	80	50	50	10	N	0	0	0	N
		3	80		60		40		5		0		0	
3	2000	1	80		80		80		80		50		50	
		2	80	N	80	80	80	N	80	N	60	70	50	70
		3	80		80		80		70		40		40	
4	1000	1	80		80		80							
		2	80	N	80	80	80	N	80	80	80	80	80	80
		3	80		80		80							
5	500	1												
		2	80	N	80	N	80	80	80	N	80	N	80	N
		3												
6	200	1												
		2	80	N	80	N	80	N	80	N	80	N	80	N
		3												
Kon- trole		1												
		2	80	N	80	80	80	N	80	80	80	N	80	80

N — netestováno
 CA — ciliární aktivita
 SDH — sukcinátdehydrogenáza

pině s koncentrací 3120 μ g na 1 ml média byly pozorování první dystrofické změny buněk a snížení ciliární aktivity také za 72 hodiny. Další vývoj změn byl pozvolný až do 12. dne, kdy byly ještě pozorovány úseky epiteliálních buněk s ciliární aktivitou, kterým odpovídaly ostrůvky SDH aktivních buněk.

V analogickém pokuse, sledujícím toxicitu penicilinu pro tracheální explantáty, byly zjištěny změny v prvních třech skupinách, odpovídajících koncentracím 6000, 4000 a 2000 m. j. penicilinu na 1 ml média (tab. II).

Zatímco v prvních dvou skupinách docházelo k rychlým degenerativním změnám buněk víceřadého epitelu, jejichž charakter byl obdobný jako u explantátů s vyšší koncentrací Tylanu, uchoval si epitel ve třetí skupině neporušenou strukturu i funkci až do sedmého dne kultivace. V následujících pěti dnech se však začaly objevovat v epitelu drobné degenerativní změny, které se zvolna rozšiřovaly až do 12. dne. Ve skupi-

III. Cytotoxický účinek Tylanu na buněčné kultury embryonálních telecích ledvin

Skupina	Dávka v μg	Explantáty	Dny kultivace					
			2	3	5	7	9	12
1	25 000	1	50	10	0	0	0	0
		2	50	5	0	0	0	0
		3	50	5	0	0	0	0
2	12 500	1	60	30	0	0	0	0
		2	50	30	0	0	0	0
		3	50	20	0	0	0	0
3	6 250	1	80	40	30	0	0	0
		2	60	50	30	0	0	0
		3	60	50	40	0	0	0
4	3 120	1	80	80	60	30	10	5
		2	80	80	60	10	10	10
		3	70	70	50	10	10	5
5	1 562	1				60	50	50
		2	90	90	90	60	50	50
		3				50	40	40
6	781	1					100	
		2	100	100	100	100	90	100
		3					100	
7	390,5	1						
		2	100	100	100	100	100	100
		3						
8	195,3	1						
		2	100	100	100	100	100	100
		3						
9	kontrola	1						
		2	100	100	100	100	100	100

N — netestováno

nách s nižší koncentrací penicilinu nebyly po celou dobu sledování zjištěny podstatné změny od explantátů kontrolních.

Pro testování toxicity Tylanu na buněčných kulturách embryonálních telecích ledvin bylo použito stejných koncentrací v udržovacím médiu jako u testovaných orgánových kultur. Z výsledků uvedených v tab. III je zřejmé, že toxické působení bylo zaznamenáno ve skupinách s koncentrací 25 000 až 1562 μg na 1 ml média. Výrazné degenerativní změny, projevující se zkracováním a zakulacováním buněk a jejich vypadáváním z monolayeru do média, byly pozorovány v prvních třech skupinách, kde již po sedmidenní kultivaci zůstaly na skle jen ojedinělé ostrůvky zcela degenerovaných buněk. Pozvolnější vývoj změn byl pozorován v dalších

dvou skupinách (koncentrace 3120 a 1562 μg), kde až do pátého dne kultivace nedošlo k porušení kontinuity porostu, ale v monolayeru byla přesto patrna ložiska 20 až 30 zvětšených buněk s vakuolizací cytoplazmy a se ztrátou jaderné struktury. V dalších dnech se ložiska postupně zvětšovala a degenerované buňky odpadávaly do média. Ve skupině s koncentrací Tylanu 781 μg na 1 ml média nebyly v průběhu pokusu zjištěny podstatné rozdíly od kontrol a v dalších dvou skupinách byl charakter porostu po 12 dnech kultivace dokonce lepší ve srovnání s kontrolami.

DISKUSE

I když propracování metodiky orgánových kultur přineslo v posledních letech řadu nových poznatků o možnostech jejich využití při studiu patogeneze i v diagnostice respiračních virů lidí a zvířat, zůstávají některé problémy spolehlivé izolace a identifikace dosud neobjasněny (L a i e r, 1970, S c h a a f f a j., 1971, R e e d, 1971).

Jedním z těchto problémů je včasná eliminace bakterií a mykoplazmat z vyšetřovaných materiálů, neboť v případě respiračních onemocnění se již v časných stadiích infekčního procesu podílejí na vzniku lézí vedle primárních virů v řetězové návaznosti mykoplazmata a bakterie.

Vzhledem k této skutečnosti může být metoda orgánových kultur připravených přímo z vyšetřovaných tkání pokládána za málo spolehlivou, neboť přežívání a případné množení bakterií a mykoplazmat v těchto kulturách podstatně snižují naději na úspěšnou izolaci viru. Z antibiotik vhodných k eliminaci především mykoplazmových zárodků z buněčných kultur byly pro svou nízkou toxicitu a vysokou účinnost doporučovány přípravky na tylosinové bázi (M a c p h e r s o n 1966, F r i e n d a j., 1966). Zmíněné vyhovující vlastnosti tylosinových přípravků jsou předpokladem jejich úspěšného využití i v přípravě orgánových kultur, kde problematika antibiotické ochrany explantátů zůstává dosud na použití penicilinu a streptomycinu podle původních návodů H o o r n a (1966). Výsledky našich pokusů, v nichž jsme zjišťovali toxicitu tylosinového přípravku pro orgánové a buněčné kultury nejčastěji používané v diagnostické praxi virových respiračních infekcí telat, ukazují, že přítomnost 781 μg Tylanu na 1 ml média nevyvolává po dobu dvanáctidenní kultivace ve srovnání s kontrolami cytotoxické změny v monolayeru primárních buněčných kultur embryonálních telecích ledvin, ani v epitelu telecích tracheálních explantátů. Skutečnost, že u orgánových kultur tracheálních explantátů nebyly zaznamenány podstatné změny dokonce ani při dávce 1562 μg Tylanu na 1 ml média, ukazuje na větší odolnost diferencovaných epitelálních buněk ve srovnání s buňkami buněčných kultur.

Ačkoliv naše výsledky je možné srovnávat pouze v oblasti buněčných kultur, neboť obdobné údaje o orgánových kulturách neexistují, je možné konstatovat, že námi použitý přípravek na tylosinové bázi je ve srovnání s jinými širokospektrálními antibiotiky, jako je např. tetracyklin HCl, 7-chlortetracyklin, chloramfenikol (P e r l m a n a B r i n d l e, 1963), kanamycin (P o l l o c k a j., 1960), aureomycin (H e a r n a j., 1959), poměrně málo toxický. M a c p h e r s o n (1966), který sledoval cytotoxické působení jednotlivých antibiotik na buněčné kultury, uvádí cytotoxickou dáv-

ku pro Tylosin 300 μg na 1 ml média ve srovnání s tetracyklinem (35 μg na 1 ml), chloramfenikolem (30 μg na 1 ml) a 7-chlortetracyklinem (80 μg na 1 ml média).

Naše výsledky, které ve srovnání s Macphersonem (1966) ukazují ještě nižší toxicitu, mohou být ovlivněny jak použitím odlišných substrátů k testování, tak také použitím odlišných testovaných přípravků. Je možné, že určitou kladnou úlohu v testování toxicity sehrála v našem případě vhodná kombinace Tylosinu s citrátem sodným. Pro srovnání byla v našich pokusech testována toxicita běžně používaného antibiotika penicilinu (draselná sůl) pro tracheální explantáty. Limitní koncentrace 1000 m. j. na 1 ml média odpovídá zjištění jiných autorů pro buněčné kultury (Perlman a Brindle, 1963, Lennette a Schmidt, 1974), i pro orgánové kultury (Hoorn, 1966).

Vedle toxicity tylosinových přípravků byla testována i jejich účinnost k potlačení mykoplazmat v buněčných kulturách. Bylo zjištěno, že tylosin je k potlačení mykoplazmové infekce vhodnější než kanamycin, erytromycin a tetracyklin (Cross aj., 1967).

Friend aj. (1966) popsali, že po ošetření buněčných kultur dávkou 50 mg tylosinu na 1 ml média ve čtyřech dnech nebo ve dvou za sebou následujících pasážích došlo k potlačení mykoplazmat. Vysokou účinnost tylosinu prokázal také Macpherson (1966), který pozoroval inhibici mykoplazmat v bujónové kultuře po dávce 1 mg na 1 ml média.

Vzhledem k tomu, že se jedná o literární údaje staršího data, kdy jednak byl znám mnohem menší počet druhů mykoplazmat, a jednak se od té doby vyvinuly citlivější izolační metody, je třeba tyto údaje prověřit a v další práci se zaměřit na nově izolované druhy mykoplazmat. Z tohoto aspektu by měla být studována především účinnost tylosinu na mykoplazmata, uplatňující se v etiologii respiračních infekcí telat.

Je možné tedy předpokládat, že pro nízkou toxicitu a široké antimikrobiální spektrum pokrývající i mykoplazmata může být Tylan vhodným preparátem nejen k potlačení nežádoucí bakteriální a mykoplazmové infekce ve virologické diagnostické praxi, ale může najít vhodné uplatnění i v prevenci respiračních infekcí telat v našich velkochovech.

Literatura

CROSS, G. F. — GOODMAN, M. R. — SHAW, E. J.: Detection and treatment of contaminating mycoplasmas in cell culture. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 45, 1967, s. 201-212.

DULBECCO, R. — VOGT, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. exp. Med.*, 99, 1954, s. 167-182.

FINKELSTEIN, M. S. — WILLIAMS, M. V. — HUIZENGA, C. G.: Use of chickens tracheal organ cultures for studying resistance of respiratory epithelium to viral infection. *J. Immun.*, 108, 1972, s. 183-190.

FRIEND, C. — PATULEIA, M. C. — NELSON, J. B.: Antibiotic effect of Tylosin on a mycoplasma contaminant in a tissue culture leukemia cell line. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 121, 1966, s. 1009-1010.

HEARN, H. J. — OFFICER, J. E. — ELSNER, V. — BROWN, A.: Detection, elimination and prevention of contamination of cell cultures with pleuropneumonia-like organisms. *J. Bact.*, 78, 1959, s. 575-582.

HOORN, B.: Organ cultures of ciliated epithelium for the study of respiratory viruses. *Acta path. microbiol. scand.*, 66 (Suppl. 183), 1966, s. 1-37.

- HOORN, B. — TYRRELL, D. A. J.: Organ cultures in virology. *Prog. med. Virol.*, 11, 1969, s. 408-453.
- LAIER, H. R.: Organ cultures in evaluation of antiviral drugs. I. Virus infection in trachea explants as potential model system for evaluation of antiviral drugs against respiratory viruses. *Arch. ges. Virusforsch.*, 30, 1970, s. 379-396.
- MACHATKOVÁ, M. — POSPÍŠIL, Z. — MENŠÍK, J.: Kultivace orgánových kultur připravených z respiračního traktu telat. *Vet. Med. (Praha)* 19, 1974, č. 9, s. 565-570.
- MACPHERSON, I.: Mycoplasmas in tissue culture. *J. Cell Sci.*, 1966, č. 1, s. 145-168.
- MENŠÍK, J. — ČEPICA, A. — FRANZ, J. — MACHATKOVÁ, M. — POSPÍŠIL, Z. — ROZKOŠNÝ, V. — SUCHÁNKOVÁ, A. — ŠMÍD, B. — ŠTĚPÁNEK, J. — VALÍČEK, L.: Diagnostika respiračních infekcí skotu. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1973. 73 s.
- PERLMAN, D. — BRINDLE, S. A.: Antibiotic control of contamination in tissue cultures. Antimicrobial agents and chemotherapy. In: *Proceedings of the 3rd Inter-science Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Washington D. C., October 28—30 (1963).
- PERLMAN, D. — RAHMAN, S. B. — SEMAR, J. B.: Antibiotic control of mycoplasma in tissue cultures. *Appl. Microbiol.*, 15, 1967, s. 82-85.
- POLLOCK, M. E. — KENNY, G. E. — SYVERTON, J. T.: Isolation and elimination of pleuropneumonia like organisms from mammalian cell cultures. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 105, 1960, s. 10-15.
- REED, S. E.: Persistent respiratory virus infection in tracheal organ cultures. *Br. J. exp. Path.*, 50, 1969, s. 378-388.
- REED, S. E.: The interaction of mycoplasmas and influenza viruses in tracheal organ cultures. *J. infect. Dis.* 124, 1971, s. 18-21.
- SCHAAFF, D. M. — BOSWELL, J. — MUFSON, M. A.: Viral and mycoplasmal infection in minor respiratory illness and non streptococcal pharyngitis. A search for coronaviruses using fetal trachea organ cultures. *Am. Rev. resp. Dis.*, 104, 1971, s. 41-51.
- WIGMORE, J. O. — HENDERSON, W. M.: Control of yeast contamination by Mycostatin in tissue cultures of virus of foot- and mouth disease. *Nature*, 176, 1955, s. 516-518.

Došlo dne 12. 6. 1975

ROZKOŠNÝ V., POSPÍŠIL Z., VRBA Z. (Naучно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Влияние тилана на культивацию клеточных и органных культур, полученных из тканей телят. *Vet. Med. (Praha)* 20 (10-11): 623-631, 1975.

При помощи проверки цитотоксичности препарата тилан на клеточных культурах эмбриональных телячьих почек было установлено, что концентрация 781 μg на 1 мл поддерживающей среды еще не вызвала в течение 12-дневной культивации изменений в клеточном посеве. В повышенных концентрациях тилан действует токсически. В органных культурах телячьих трахеальных эксплантатов еще при концентрации 1562 $\mu\text{g}/\text{мл}$ поддерживающей среды во время 12-дневной культивации не наблюдалось существенных изменений по сравнению с контрольными эксплантатами. При более высоких концентрациях в эпителие эксплантатов наблюдались дистрофические изменения, развитие и интенсивность которых зависели от применяемой концентрации тилана. При помощи проверки цитотоксичности пенициллина (калийная соль) для трахеального эксплантата была установлена предельная концентрация 1000 м.е. на 1 мл среды.

тилан (Tylosin Tartrate Sterile Injectable); пенициллин; цитотоксичность; трахеальные эксплантаты; клеточная культура

ROZKOŠNÝ V., POSPÍŠIL Z., VRBA Z. (Veterinary Research Institute, Brno; Zenit, Brno, Czechoslovakia). *The Effect of Tylan on the Cultivation of Cellular and Organ Cultures Derived from Calf Tissue*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 623-631, 1975.

The testing of the cytotoxicity of the Tylan preparation (Tylosin Tartrate Sterile Injectable) on the cell cultures of embryonic calf kidneys revealed that even the concentration of 781 μg per 1 ml of maintenance medium did not cause any changes in the cell culture within the period of twelve-day cultivation. In higher concentrations Tylan had a toxic effect. At the concentration of 1562 μg per 1 ml of maintenance medium, no greater changes (in comparison with control explants) were observed in the organ cultures of calf tracheal explants in the course of twelve-day cultivation. At higher concentrations, the epithelium of explants showed dystrophic changes whose development and intensity depended on the dose of Tylan applied. The tests of penicillin (potassium salt) cytotoxicity to calf tracheal explants revealed the limiting concentration of 1000 i. u. per 1 ml of medium.

Tylan; penicillin; tracheal explants; cell culture

ROZKOŠNÝ V., POSPÍŠIL Z., VRBA Z. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno; Zenit, Brno, Tschechoslowakei). *Einfluß des Tylans auf die Kultivation der aus Kalbsgeweben derivierten Zell- und Organkulturen*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 623-631, 1975.

Durch Testen der Zytotoxizität des Präparats Tylan (Tylosin Tartrate Sterile Injectable) auf Zellkulturen von embryonalen Kälbernieren wurde festgestellt, daß die Konzentration von noch 781 μg je 1 ml Erhaltungsmedium bei zwölftägiger Kultivation in den Zellen keine Veränderungen auslöst. In höheren Konzentrationen wirkt das Tylan toxisch. In Organkulturen von tracheal Kälberexplantaten wurden noch bei einer Konzentration von 1562 μg je 1 ml Erhaltungsmedium während einer zwölftägigen Kultivation keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollexplantaten festgestellt. Bei höheren Konzentrationen wurden im Explantatenepithel dystrophische Veränderungen beobachtet, deren Entwicklung und Intensität von der benutzten Tylankonzentration abhängig waren. Durch Testen der Zytotoxizität des Penizillins (Kaliumsalz) für Trachealexplantate wurde als limitierende Konzentration 1000 I. E. je 1 ml Medium festgestellt.

Tylan; Penizillin; Zytotoxizität; Trachealexplantate; Zellkultur

Adresa autorů:

MVDr. V. Rozkošný, MVDr. Z. Pospíšil, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno - Medlánky
MVDr. Z. Vrba, Zenit, Sady osvobození 15, 600 00 Brno

LEHRBUCH DER ANATOMIE DER HAUSTIERE (BAND IV) NERVENSYSTEM, SINNENORGANE, ENDOKRINE DRÜSEN

R. Nickel, A. Schummer, E. Seiferle
Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1975

Anatomie domácích zvířat (zpracovaná Nicklem, Schummerem a Seiferlem) se ve svém čtvrtém svazku, jehož autorem je Seiferle, zabývá problematikou nervové soustavy, smyslovými ústroji a žlázami s vnitřní sekrecí. Vydáním této knihy se doplňuje uvedené dílo projektované do pěti samostatných svazků, z kterých tři už byly publikovány (pohybový aparát, vnitřnosti, anatomie domácích ptáků), a v současné době se předložila odborné veřejnosti kniha výše uvedená. V roce 1975, event. 1976 se předpokládá vydání knihy poslední (oběhový aparát, kůže a kožní orgány), která bude tvořit třetí část celého díla.

Problematika nervové soustavy, smyslových orgánů a žláz s vnitřní sekrecí je zpracována na 426 stránkách, z čehož nervová soustava na 316, smyslové orgány na 61 a žlázy s vnitřní sekrecí na 19 stranách. Mimoto je kniha doplněna v textu 250 obrazy, z toho 19 barevnými.

Obsah knihy, jak je vidět z uvedeného přehledu, se převážně věnuje anatomii integrujících soustav, z kterých zvláště soustava nervová je zpracována, v porovnání s knihami podobného charakteru, vyčerpávajícím způsobem na základě relativně nejnovějších poznatků z literatury. Vzhledem k prvořadému významu této anatomické problematiky pro ovládnutí fyziologie a patofyziologie je toto dílo mimořádně cenným přínosem nejen pro vlastní studium, ale i k rozvíjení vědecké práce v této oblasti. Celá problematika nervové soustavy začíná obecnými pohledy na tuto soustavu, přičemž se zabývá fylogenetickým a ontogenetickým vývojem, ontogenetickým vývojem CNS, srovnávací morfologií mozku, popisem nervové tkáně, její degenerací i regenerací. Tato obecně zpracovaná část představuje dobrý vstup pro popis a pochopení centrální a periferní nervové soustavy a pochopení jejího významu jako soustavy integrační. Přehlednost a detailnost zpracování této soustavy a doplnění této významné statě celou řadou velmi instruktivních a dobře pochopitelných černobílých a barevných obrazů představuje v současné době zatím nejkompletnější zpracování této soustavy v současné světové knižní literatuře zabývající se anatomii domácích zvířat.

Druhá integrující soustava – žlázy s vnitřní sekrecí – je zpracována z aspektů obdobných jako soustava nervová.

Kapitola, ve které jsou zpracovány jednotlivé smyslové orgány, se po krátkém úvodu zaměřuje přímo na jednotlivé orgány, na jejich zevrubný popis, doplněný pro zvýraznění názornosti velmi kvalitním obrazovým materiálem.

Knihy je doplněna seznamem literárních pramenů, z kterých autor čerpal při zpracování jednotlivých kapitol a jedná se o literární prameny v době zpracování jednotlivých kapitol nejnovější.

Prof. MVDr. D. Čollák, CSc.
Vysoká škola zemědělská, Praha,
Provozně-ekonomická fakulta, České Budějovice

SPECIFITA DIAGNOSTICKÝCH SÉR PRO URČOVÁNÍ O-ANTIGENŮ ESCHERICHIA COLI AGLUTINACÍ

E. Salajka, Z. Šarmanová, A. Hornichová

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

SALAJKA E., ŠARMANOVÁ Z., HORNICHOVÁ A. *Specificita diagnostických sér pro určování 0-antigenů Escherichia coli aglutinací*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 633-644, 1975.

Séra králíků imunizovaných 0-antigeny typových kultur *E. coli* aglutinovala v řadě případů kromě homologního antigenu ještě jiné 0-antigeny *E. coli*. Ze sady sér proti 151 0-antigenům *E. coli* byla zjištěna monospecifita jen u 73 sér. Ostatní séra nebyla monospecifická. U 34 sér byla zjištěna reaktivita s větším počtem (15 až 113) 0-antigenů. Při imunizaci dvou nebo tří králíků stejným 0-antigenem byla získána séra, která kromě homologního antigenu aglutinovala nestejný počet jiných 0-antigenů. U sér s nežádoucí aglutinační aktivitou proti většímu počtu jiných 0-antigenů se osvědčilo vysycení 0-antigenem heterologního kmene *E. coli*, který rovněž vyvolal produkci širokého spektra aglutininů proti jiným 0-antigenům. Polyvalentní séra, získaná smícháním několika sér monovalentních, se neosvědčila. Typové 0-antigeny byly aglutinovány i těmi polyvalentními séry, do nichž nebylo zařazeno ani homologní, ani zkříženě reagující sérum.

0-antigeny; zkřížená příbuznost; antiséra; nespecifická aktivita; vysycování

Vytváření velkých stád hospodářských zvířat v období kolektivizace zemědělství aktualizovalo některá onemocnění hospodářských zvířat, která se v dřívější době v drobných hospodářstvích vyskytovala jen sporadicky a neměla tedy závažné národohospodářské důsledky. Z infekčních chorob to byly respirační a enterální infekce mláďat, které v nových podmínkách nabývaly charakteru enzootií. V období industrializace živočišné výroby tyto enzootie vystupují ještě více do popředí a představují velmi závažné nebezpečí pro ekonomiku těch úseků živočišné výroby, které jsou zaměřeny na produkci selat a telat. Vystala tedy naléhavá potřeba věnovat se těmto chorobám z hlediska jejich epizootologie, etiologie, patogenese a prevence.

Mezi nové aktuální enzootie patří nesporně koliinfekce mláďat. Dřívější rozpaky nad úkazem, že příslušníci bakteriálního druhu *Escherichia coli*, nalézání hlavně jako neškodní střevní komenzálové, byli pokládáni i za vyvolavatele smrtelných onemocnění, byly postupným získáváním nových poznatků rozptýleny.

Taxonomická kritéria pro zařazení bakterií do uznávaných rodů či druhů zahrnují kromě vlastností růstových, morfologických a tinkčních

hlavně enzymatickou aktivitu vůči řadě substrátů. Tato kritéria však nestačila pro rozlišení patogenních *Escherichii* od nepatogenních. Patogenita bakterií není zpravidla ani mezi taxony zahrnována. Další třídění uvnitř bakteriálních druhů je do určité míry umožněno rozlišováním antigenních determinant a dále průkazem produkce toxických substancí.

Sérologická diferenciacie antigenů *E. coli*, započatá v roce 1943 Kauffmannem, prokázala, že kmeny *E. coli* vyvolávající průjemy u dětí bylo možno zařadit do několika málo séro skupin (026, 055, 0111, 0126) odlišných od séro skupin kmenů saprofytických a kmenů vyvolávajících jiná onemocnění. Práce veterinárních mikrobiologů (Wramby, 1948, Sojka aj., 1957) ukázaly, že kmeny patogenní pro mláďata hospodářských zvířat přísluší do několika jiných séro skupin. Tato zjištění měla za následek jednak dedukci, že patogenní typy *E. coli* jsou druhově specifické a antigenně odlišné od kmenů saprofytických, jednak snahu patogenní typy diferencovat sérotypizací. Tato snaha je dokumentována tím, že do současné doby již bylo u druhu *E. coli* mezinárodně evidováno 157 O-antigenů (somatických), 93 K-antigenů (kapsulárních nebo obalových) a 52 H-antigenů (řasinkových).

Přítomnost K-antigenů zpravidla brání vazbě O-antigenů se specifickou protilátkou. Proto při sérologické typizaci O-antigenů je nutné předem K-antigen rozrušit buď povařením kultur ve vodní lázni při teplotě 100 °C (v případech K-antigenů typu L a B), nebo autoklávací při teplotě 121 °C (v případech K-antigenů typu A). Při termické preparaci se současně rozruší i H-antigeny.

Vlastní sérotypizace *Escherichia coli* sama o sobě představuje svízelný problém, který je dán dvěma příčinami:

- 1) *Escherichia coli* je bakteriální druh o mimořádně velkém počtu sérotypů, z čehož vyplývá potřeba velkého počtu specifických diagnostických sér.
- 2) Příslušníci bakteriálního druhu *E. coli* představují významnou součást střevní flóry zdravých zvířat. Střevní flóra představuje antigenní impuls, na který hostitel odpovídá tvorbou protilátek a tyto protilátky jednak ve formě koproantilátek zpětně ovlivňují složení střevní flóry, jednak se objevují v krevním séru a jsou podstatou tzv. přirozených protilátek. V důsledku toho jsou i v séru neimunizovaných zvířat přítomny protilátky, které reagují s řadou sérotypů *E. coli* (Salajka, 1967, Kashiwazaki a Namioaka, 1969). Jejich hladiny u obvyklých donátorů diagnostických sér — králíků — bývají sice nízké, ale při imunizaci se často projeví nespecifický „booster efekt“, který má za následek zvýšení titru aglutininů proti jiným antigenům.

Je však možné konstatovat, že v řadě publikací zabývajících se sérotypizací *E. coli* je okolnost zkřížených a nespecifických reakcí diagnostických sér brána v úvahu minimálně, nebo je vůbec opomenuta, přestože Ewing aj. (1956) v samostatné monografii zveřejnili výsledky zkříženého sérologického vyšetření typových kultur *E. coli* séro skupin 01-0137 a zjištěné četné zkřížené reakce interpretovali jako reciproční a unilaterální příbuznost mezi antigeny *E. coli*. Tak např. u O-antigenů standardního reprezentanta séro skupiny 01 uvádějí reciproční příbuznost se skupinami 02, 050, 064 a současně unilaterální příbuznost s 010, 014, 070

a 0117. Ze 137 typových O-antigenů uváděných v této práci nebyla pouze u 21 typového kmene zjištěna zkrřížená aglutinace se sérem jiného typu. Obdobné údaje uvádějí tito autoři i u K- a H-antigenů *E. coli*.

Zkrříženou antigenní příbuznost některých sérotypů *E. coli* s příslušníky jiných rodů z čeledi *Enterobacteriaceae* zjistila řada pracovníků. Přehled o těchto údajích uvádí ve své monografii S o j k a (1965).

Zvláštní případ heterospecifické sérologické příbuznosti představuje společný antigen *Enterobacteriaceae*, který objevili K u n i n a j. (1962). Tito pracovníci zjistili, že sérum *E. coli* 014 reaguje v reakci inhibice hemaglutinace s velkou řadou O-séroskopin *E. coli* a se zástupci dalších rodů čeledi *Enterobacteriaceae*.

S ohledem na uvedené okolnosti, které mohou nepříznivě ovlivňovat specifitu diagnostických sér, bylo v této práci provedeno zkrřížené vyšetření řady antisér k určování O-antigenů *E. coli* pomalou aglutinací. Dále jsme se pokusili o odstranění nežádoucí aglutinační aktivity u sér, která se touto vlastností vyznačovala, a o sestavení sady sér použitelné pro typizaci O-antigenů suspektně patogenních kmenů *E. coli*, izolovaných z hospodářských zvířat.

MATERIÁL A METODA

KMENY *E. COLI*

Základním materiálem byly typové kultury *E. coli* pro 0-antigeny 01-0157 získané prostřednictvím Československé sbírky mikroorganismů z International Escherichia Centre v Kodani. Z této řady byly podle sdělení z uvedeného centra vyřazeny typové kultury 031, 047, 067, 072, 094 a 0122 z důvodů uhynutí či příslušnosti k jiným bakteriálním druhům, takže pro přípravu antigenů a sér byl použit 151 kmen *E. coli*.

TYPIZAČNÍ SÉRA

Monovalentní typizační séra byla připravena imunizací králíků 0-antigeny uvedených typových kultur. Bujónové kultury (18 hodin při teplotě 37 °C), autoklávované dvě hodiny při 1,5 atm přetlaku byly dvakrát vyprány ve fyziologickém roztoku a pak rozsuspendovány na objem původní kultury ve fyziologickém roztoku s 0,5 % fenolu. Takto připravený 0-antigen byl vstříkovan králíkům i. v. ve třídenních intervalech ve stoupajícím množství: 0,25 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml a 2,0 ml. Za tři až pět dní po poslední imunizační dávce byla odebírána krev z ušní vény pro orientační vyšetření titru specifických aglutininů. Pokud titr nedosahoval hodnoty 5120, byla podána ještě jedna dávka (2 ml) 0-antigenů. Pak již bez ohledu na to, zda došlo či nedošlo ke zvýšení hladiny aglutininů, byl králík za osm dní po poslední injekci antigenu vykrven kardiální punkcí. Získané sérum bylo konzervováno aa sterilním glycerinem, smíchaným rovněž aa s fyziologickým roztokem s přídavkem merthiolátu (1 : 10 000).

Kromě titru specifických aglutininů se u každého séra zjišťovalo vhodné pracovní ředění. Sérum bylo naředěno fenolizovaným fyziologickým roztokem v poměrech 1 : 10, 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800 a 1 : 1600. K 0,1 ml uvedených ředění séra bylo přidáno po 0,5 ml 0-antigenů (jeho příprava je uvedena dále v textu). Po 18 až 20hodinové inkubaci v termostatu při teplotě 37 °C byly odečítány výsledky. Jako pracovní ředění se pak používalo nejvyšší ředění séra, které v množství 0,1 ml dávalo s 0,5 ml antigenu výraznou aglutinační reakci. Čím vyšší je titr aglutininů, tím je sérum vhodnější, neboť při vyšším ředění se vylučuje vliv řady eventuálně přítomných nespecifických protilátek, projevujících se při ředění nižším.

Většina sér připravených imunizací jednotlivými antigeny byla zastoupena jedním sérem. Ve 28 případech bylo zařazeno po dvou sérech a v pěti případech po třech sérech proti jednomu antigenu. Celkem tedy byla aglutinační aktivita vyšetřována u 189 monovalentních sér se 151 O-antigeny.

ANTIGENY PRO AGLUTINACI

O-antigeny byly připravovány tak, že kultury *E. coli* byly naočkovány do maso-peptonového bujónu ve zkumavkách a inkubovány přes noc v termostatu při teplotě 37 °C. Pak se dvouhodinovou autoklávací při 1,5 atm přetlaku rozrušily K-antigeny. Po zchlazení byly antigeny konzervovány přidávkem 10 % vodné suspenze fenolu na výslednou koncentraci 0,5 % fenolu a upravena hustota nefelometrem na standardní hodnotu 0,5 miliardy zárodků v 1 ml.

PROVEDENÍ A POSOUZENÍ AGLUTINAČNÍCH REAKCÍ

Vlastní vyšetření reaktivity sér s O-antigeny se dělala pomalou aglutinací ve zkumavkách. Séra v pracovním ředění byla rozplněna do aglutinačních zkumavek v množství à 0,1 ml. Pak následovalo přidání antigenů v množství à 0,5 ml automatickou pipetou. Při tomto způsobu rozplňování antigenu došlo současně k jeho promíchání se sérem. Jako kontrola byl zařazován antigen bez séra. Po 18 až 20hodinové inkubaci v termostatu při teplotě 37 °C byly odečítány výsledky. Reakce byly posuzovány při umělém osvětlení stolní lampou se stínidlem postaveným tak, že zkumavka byla dobře osvětlena, ale světlo nevnikalo do očí posuzující osobě.

VÝSLEDKY

Titry specifických aglutininů u 189 vyšetřovaných monovalentních sér byly v rozmezí 80 až 20 480, a to 20 480 u 65 sér, 10 240 u 27 sér, 5120 u 29 sér, 2560 u 30 sér, 1120 u 21 séra, 640 u 5 sér, 320 u 6 sér, 160 u 3 sér a 80 u 3 sér. Použitelná pracovní ředění byla tato: 1 : 200 u 41 séra, 1 : 100 u 71 séra, 1 : 50 u 52 sér, 1 : 25 u 17 sér a 1 : 10 u 8 sér.

Při zkříženém vyšetření 189 sér se 151 O-antigeny dávala všechna séra v použitém pracovním ředění zřetelnou aglutinaci (na 4⁺) s odpovídajícími O-antigeny, použitými k jejich přípravě. Kromě těchto specifických reakcí bylo v řadě případů zjištěno, že séra v pracovním ředění aglutinovala (na 2⁺ až 4⁺) ještě O-antigeny jiných typových kultur *E. coli*. Ze zkoušených 189 sér reagovala jako monovalentní pouze 73 séra. U všech ostatních sér byly zjištěny vedlejší reakce buď s menším počtem jiných antigenů (82 sér), nebo s větší řadou antigenů (34 séra).

V případech, kdy jeden antigen byl použit k imunizaci dvou nebo tří králíků, byla získána séra, která se značně lišila přítomností nespecifických aglutininů. Přehled o nespecifické aglutinační aktivitě těchto sér je uveden v tab. I. V této sadě sér byla i dvě séra proti antigenu O14, o němž Kunin aj. (1962) uvádějí, že má dobře vyvinutý společný antigen Enterobacteriaceí. Avšak ze dvou sér proti tomuto antigenu reagovalo s velkým počtem O-antigenů pouze jedno, a to sérum králíka č. 273, které vykazovalo zkříženou aglutinační aktivitu se 17 O-antigeny a jednostrannou se 74 O-antigeny. Sérum králíka č. 491, imunizovaného rovněž antigenem O14, reagovalo zkříženě pouze se šesti O-antigeny a jednostranně se dvěma O-antigeny. Úkaz rozdílné nespecifické aktivity jako u sér proti antigenu O14 byl zjištěn ve 27 případech, které jsou vesměs uvedeny v tab. I.

I. Nespecifická aglutinační aktivita sér králíků imunizovaných stejnými 0-antigeny *E. coli*

Antisérum		Počet vedlejších reakcí	
séro-skupina	číslo králíka	zkříže-ných	jedno-stranných
08	240	1	0
	362	1*)	2**)
	460	1	30
09	269	0	1
	262	0	0
	285	0	0
014	273	17	74
	491	6	2
018	461	26	69
	493	6	3
024	276	17	20
	494	10	7
027	277	0	26
	495	0	0
029	279	0	44
	492	0	7
034	281	8	15
	496	3	0
041	294	2	40
	497	0	2
058	308	2	52
	498	0	2
059	309	4	68
	499	0	2
064	315	6	63
	500	1	2
078	194	2	0
	210	1	0
085	333	12	40
	529	2	1
086	400	2	5
	515	1	3
087	335	21	35
	508	19	41

Antisérum		Počet vedlejších reakcí	
séro-skupina	číslo králíka	zkříže-ných	jedno-stranných
092	340	31	70
	509	11	4
0100	346	5	84
	510	2	13
0103	134	8	30
	511	0	0
0104	348	14	39
	512	4	2
0105	349	14	42
	513	2	4
0107	371	36	70
	516	27	50
0115	139	16	97
	517	5	3
0127	143	14	87
	518	4	1
0128	144	19	40
	530	5	4
0131	389	30	34
	520	27	51
0133	145	37	39
	527	9	4
0137	146	23	36
	185	1	0
	528	4	0
0138	220	1	1
	467	2	5
0139	129	1	0
	243	1	0
	502	0	6
0141	471	0	0
	466	34	60
	503	32	53
0147	211	1	3
	468	40	38
0149	439	0	4
	474	0	1

*) Sérum proti antigenu 08 aglutinuje i antigen 093

Sérum proti antigenu 093 aglutinuje i antigen 08

**) Sérum proti antigenu 08 aglutinuje i antigeny 02 a 074

Séra proti antigenům 02 a 074 neaglutinují antigen 08

II. Vysycení nežádoucích aglutininů antigenem 0131

Sérum nevysycené

Antigen	Kon- trolla	séroskopina /č. králíka/ prac. ředění									
		014	014	017	018	020	027	049	069	092	0141
		273	491	564	461	115	277	300	319	340	466
		100	200	200	200	200	200	200	200	200	200
014	—	4+	4+	1+	3+	1+	2+	3+	2+	3+	3+
017	—	4+	1+	4+	3+	—	2+	2+	3+	3+	2+
018	—	4+	—	—	4+	—	2+	1+	1+	3+	2+
020	—	4+	—	—	2+	4+	2+	3+	2+	3+	2+
027	—	4+	1+	—	2+	—	3+	2+	2+	3+	2+
049	—	4+	3+	—	3+	—	3+	4+	3+	4+	3+
069	—	4+	1+	—	2+	—	2+	2+	4+	2+	3+
092	—	3+	3+	1+	3+	1+	3+	3+	3+	4+	3+
0141	—	3+	2+	1+	3+	1+	2+	3+	3+	3+	4+
02	—	4+	—	—	1+	—	—	1+	1+	1+	1+
08	—	4+	—	—	1+	—	1+	1+	2+	3+	1+
09	—	4+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
015	—	4+	1+	—	2+	—	1+	3+	3+	3+	2+
045	—	4+	1+	—	3+	—	1+	2+	2+	3+	2+
073	—	4+	1+	2+	2+	—	1+	2+	3+	3+	3+
078	—	4+	1+	1+	3+	1+	1+	3+	3+	3+	2+
0101	—	4+	—	—	3+	—	1+	3+	3+	3+	3+
0115	—	4+	—	—	1+	—	1+	1+	2+	2+	2+
0116	—	4+	—	—	—	—	—	—	1+	1+	1+
0117	—	4+	—	—	2+	—	1+	2+	3+	2+	2+
0137	—	4+	1+	—	4+	—	2+	2+	3+	3+	3+
0139	—	4+	—	—	2+	—	—	2+	3+	2+	2+
0147	—	4+	—	—	3+	—	1+	1+	1+	2+	1+
0149	—	4+	1+	3+	3+	—	1+	1+	2+	2+	1+

Výsledky tohoto vlastního šetření byly porovnány s výsledky Ewinga aj. (1956). V citované monografii byla ze 137 sér proti O-antigenům *E. coli* zjištěna monospecifita u 46 sér. Souhlasnost v monospecifitě sér obou souborů byla ve 24 případech. Souhlasnost ve vedlejších zkřížených reakcích byla zjištěna v osmi případech pro jeden nespecifický antigen, čtyřikrát pro dva antigeny a jedenkrát pro tři antigeny. Převážná většina vedlejších reakcí ať již zkřížených či jednostranných ve srovnávaných souborech sér byla odlišná.

Uvedené výsledky ukázaly, že pouze část sér byla vhodná pro přímé použití k typizaci O-antigenů *E. coli*. U větší části sér bylo třeba uvažovat o odstranění nežádoucích zkřížených reakcí. Jelikož vysycování s větší řadou antigenů nepřicházelo v úvahu, byly pokusně zkoušeny dva jiné způsoby k odstranění nežádoucích aglutininů, a to: a) vysycení sér O-antigenem takového kmene *E. coli*, který provokoval produkci protilátek proti velké řadě O-antigenů (byl zvolen antigen 0131); b) vyvázání specifické

Sérum vysycené

séroskopina /č. králíka/ prac. ředění									
014	014	017	108	020	027	049	069	092	0141
273	491	564	461	115	277	300	319	340	466
100	100	200	200	50	100	100	200	50	200
4+	3+	—	—	—	—	—	—	1+	—
1+	—	4+	—	—	—	—	—	2+	—
—	—	—	3+	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	4+	—	—	—	1+	—
1+	1+	—	—	—	4+	—	—	1+	—
1+	—	—	—	—	—	4+	—	1+	—
1+	—	—	—	—	—	—	3+	1+	—
—	—	—	—	—	—	—	—	4+	—
1+	—	—	1+	—	—	—	—	1+	3+
1+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1+	—	—	—	—	—	—	—	1+	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1+	—	2+	—	—	—	—	—	1+	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2+	—	—	—	—	—	—	—	—	—

kých protilátek na suspenzi homologního kmene *E. coli* a jejich následné uvolnění vlivem 2,5 M MgCl₂ (modifikace metody z práce Glausera a Islikera, 1971). Z těchto dvou zkoušených postupů se u řady sér osvědčilo vysycení antigenem 0131 (tab. II).

Postup druhý nedal žádoucí výsledek, jelikož u protilátek vyvázaných na homologní kmen a pak uvolněných se nadále objevovala nespecifická reaktivita s řadou jiných O-antigenů.

Ve snaze po zjednodušení typizace při zařazení maximálního počtu typizačních sér bylo zkoušeno použití polyvalentních skupinových sér připravených smícháním sér monovalentních. Zkoušení tohoto způsobu typizace bylo založeno na předpokladu, že kmeny *E. coli* určené k sérotypizaci by byly testovány nejprve s několika séry polyvalentními a podle výsledků by pak jednotlivé kmeny byly testovány jen s těmi séry monovalentními, která jsou zastoupena v polyvalentním séru, kterým byl daný kmen aglutinován.

Nejprve byla připravena tři polyvalentní séra obsahující po deseti sérech monovalentních, která nevykazovala zkřížené reakce s jinými O-antigeny. Séra byla ve směsi zastoupena v poměrech, které odpovídaly jejich pracovním ředěním. S těmito polyvalentními séry pak byly orientačně zkoušeny kmeny *E. coli* známých séro skupin. Vyšetření však ukázalo, že řada kmenů *E. coli* dávala pozitivní aglutinační reakce s více skupinovými séry než jen s tím, které obsahovalo antisérum vůči nim.

Pak bylo připraveno sedm polyvalentních smíšených sér sestavených tak, že zkříženě reagující monovalentní séra byla dána do téhož polyvalentního séra. Tato séra byla před smícháním vysycena antigenem O131. Výsledek vyšetření aglutinační aktivity těchto sér s řadou antigenů byl však jen o něco málo lepší než s prvými třemi polyvalentními séry.

Protože výsledky s použitím polyvalentních sér byly zatím neuspokojivé, bylo od tohoto způsobu typizace v dané době upuštěno.

Jelikož použití polyvalentních sér pro typizaci *E. coli* nebylo v současné době na vlastním pracovišti uspokojivě rozřešeno a jelikož používání monospecifických antisér proti všem dosud evidovaným O-antigenům *E. coli* je mimořádně pracovně náročné, bylo rozhodnuto používat pro typizaci O-antigenů *E. coli* jen antiséra proti O-antigenům těch sérotypů *E. coli*, která jsou označovány za patogenní pro hospodářská zvířata a pro lidi.

Na základě vlastních předběžných výsledků při typizaci *E. coli* z hospodářských zvířat a podle údajů z literatury byla sestavena řada antisér, která byla rozdělena na dvě skupiny. Do první skupiny byla zařazena séra proti séro skupinám *E. coli* uváděným do souvislosti s kolinfekcemi u zvířat. Ve skupině byla 44 séra proti následujícím O-antigenům: O2, O3, O8, O8 + O141, O9, O10, O11, O13, O15, O21, O23, O24, O35, O41, O45ac, O49, O64, O69, O73, O76, O77, O78, O83, O88, O101, O102, O103, O108, O109, O115, O116, O117, O119, O133, O135, O137, O138, O140, O141, O147, O149, O150 a O157.

Druhou skupinu tvořilo 35 sér pro určování O-antigenů *E. coli* udávaných v současné době za patogenní pro člověka: O1, O4, O6, O7, O18ab, O20, O22, O25, O26, O28, O44, O51, O55, O75, O86, O111, O112ac, O114, O124, O125, O126, O127, O128, O136, O142, O143, O144, O145, O148, O151, O152, O153, O154, O155 a O156.

Výsledek zkříženého vyšetření vybraných a předem vysycených 79 antisér s antigeny použitými k jejich přípravě je uveden v tab. III. Při použití údajů uvedených v této tabulce jako klíče bylo možné u většiny typovaných kmenů *E. coli* z telat a selat určit O-antigen.

Terénní kmeny *E. coli* byly typizovány tak, že byly nejprve vyšetřeny se séry první skupiny, tj. s antiséry proti známým a suspektním zvířecím patogenům. Neurčené kmeny *E. coli* byly pak dále vyšetřovány se séry druhé skupiny, tj. proti humánním patogenům. Každý kmen byl tedy vyšetřován buď se 44 nebo 79 séry.

DISKUSE

Výsledky obsáhlého zkříženého vyšetření antisér proti typovým kulturám *E. coli* ukázaly na zvláštnost situace při typizaci bakterií rodu *Escherichia* proti situaci u bakterií jiných rodů. Tyto výsledky lze srov-

III. Reaktivita 0-antigenů *E. coli* se sadou 79 vybraných sér

Antigen	Aglutinován antiséry	
	specifickými	nespecifickými
01	01	08 + 0141, 0117, 0154
02	02	035
03	03	—
04	04	—
06	06	—
07	07	025, 069
08	08, 08 + 0141	—
08 + 0141	08 + 0141, 08, 0141	—
09	09	055
010	010	0141
011	011	—
013	013	073
015	015	—
018a,b	018a,b	—
020	020	—
021	021	—
022	022	08 + 0141, 09, 0111
023	023	—
024	024	0112a,c
025	025	—
026	026	—
028	028	0119, 0126
035	035	—
041	041	—
044	044	011
045a,c	045a,c	018a,b
049	049	0101
051	051	—
055	055	—
064	064	—
069	069	0147
073	073	011, 044, 0125
075	075	—
076	076	—
077	077	—
078	078	0141
083	083	—
086	086	—
088	088	04
0101	0101	—
0102	0102	04, 024, 026, 0103, 0141

Antigen	Aglutinován antiséry	
	specifickými	nespecifickými
0103	0103	—
0108	0108	0111
0109	0109	—
0111	0111	—
0112a,c	0112a,c	028
0114	0114	—
0115	0115	0141
0116	0116	—
0117	0117	—
0119	0119	—
0124	0124	08 + 0141, 09, 022, 0111
0125	0125	—
0126	0126	—
0127	0127	0126
0128	0128	086, 0127
0133	0133	013, 077
0135	0135	013
0136	0136	—
0137	0137	078
0138	0138	—
0139	0139	018a,b, 0141
0140	0140	—
0141	0141, 08 + 0141	0111
0142	0142	—
0143	0143	—
0144	0144	0112a,c
0145	0145	—
0147	0147	—
0148	0148	—
0149	0149	0117
0150	0150	—
0151	0151	—
0152	0152	—
0153	0153	—
0154	0154	04, 0114
0155	0155	—
0156	0156	0111, 0116, 0125
0157	0157	08 + 0141, 09, 022, 0111

nat jen s údaji, které zveřejnili již v r. 1956 Ewing aj. a které při typizaci *E. coli* někteří autoři respektovali, zatímco jiní je vůbec nebrali v úvahu. Srovnání vlastních výsledků s výsledky této práce však ukázalo, že předpokládaná rozsáhlá antigenní příbuznost mezi představiteli různých séro skupin *E. coli* je oprávněná jen omezeně, a tedy zdaleka ne v rozsahu uváděném v citované práci.

Kromě typového kmene *E. coli* s antigenem O14, u nějž Kunin aj. (1962) zjistili přítomnost antigenu společného pro *Enterobacteriaceae*, vyvolaly i jiné typové kmeny produkci protilátek reagujících s velkou řadou O-antigenů. Toto zjištění ukazuje na přítomnost společného antigenu i u řady dalších kmenů *E. coli*. Schopnost odpovídat na tento antigen tvorbou aglutininů byla zjištěna jen u některých králíků.

Nález rozdílné zkřížené aglutinační aktivity u sér získaných ze dvou či tří králíků imunizovaných stejnými O-antigeny a dále zjištění rozdílu v nálezu recipročních a unilaterálních zkřížených reakcí u obsáhlého vlastního souboru sér při srovnání s údaji z práce Ewinga aj. (1956) ukazují, že převážná část těchto zkřížených reakcí není důsledkem příbuznosti O-antigenů typových kultur *E. coli*, ale důsledkem přítomnosti protilátek proti společnému antigenu *Enterobacteriaceae*, nebo protilátek proti antigenům řady séro skupin u králíků – donátorů diagnostických sér. Tato zjištění však nepopírají existenci příbuznosti mezi typovými O-antigeny *E. coli*. Avšak ani z tohoto vlastního vyšetření, ani z citovaných údajů Ewinga aj. (1956) nelze určit, kterých O-antigenů *E. coli* se to jmenovitě týká.

Úkaz výskytu společného antigenu u řady typových kultur pro různé O-antigeny byl sice pro typizaci na první pohled nepříjemnou komplikací, ale možnost vysycení protilátek proti němu jiným kmenem podobně reagujícím tuto komplikaci odstranila. O tomto způsobu odstraňování nežádoucí aktivity typizačních sér není jinde referováno.

Závažným problémem je příprava polyvalentních sér k typizaci *E. coli*. Úkaz, kdy typové antigeny byly aglutinovány více polyvalentními séry, a to i těmi, do nichž nebylo homologní antisérum zařazeno, lze vysvětlit dosažením účinné hladiny aglutininů v důsledku jejich sumace z jednotlivých sér, u nichž ve stavu „monospecifickém“ jsou v hladinách neprůkazných. Ewing aj. (1956) navrhuje pro typizaci O-antigenů *E. coli* O1 – O137 a OX1 – OX9 používání osmi polyvalentních sér. Jednotlivá polyvalentní séra jsou sestavena tak, že séra „zkříženě reagujících O-antigenů“ jsou zařazena vedle sebe do stejného polyvalentního séra. Uvádějí však, že řada kmenů *E. coli* je aglutinovávána více polyvalentními séry.

Používání polyvalentních sér ve složení navrženém Ewingem aj. (1956) uvádí Glantz (1971), ale z jeho práce není zřejmé, jak se vypořádal s případy, kdy jeden kmen *E. coli* reagoval s více polyvalentními séry. Ve vlastní práci byl výskyt aglutinability některých kmenů *E. coli* ve více polyvalentních sérech důvodem, proč bylo od polyvalentních sér upuštěno. Snad tato okolnost více práce není na závadu v laboratořích, kde jsou k dispozici vysoce výkonné automaty pro sérotypizaci (Glantz, 1971, Guinée aj., 1972, Brent a Vosti, 1973). V poměrech, kde je k dispozici jen jednoduché vybavení, však tato okolnost práci značně ztěžovala. V této situaci se jevílo schůdnějším používání sady „monovalentních sér“, u nichž je tolerován omezený menší počet známých vedlejších reakcí s jinými O-antigeny.

Literatura

- BRENT, P. — VOSTI, K. L.: Micromethod for serogrouping *Escherichia coli*. Appl. Microbiol., 25, 1973, č. 2, s. 208-211.
- EWING, W. H. — TATUM, H. W. — DAVIS, B. R. — REAVIS, R. W.: Studies on the serology of the *Escherichia coli* group. U. S. Dep. Hlth. Serv., Atlanta, Georgia 1956, 42 s.
- GLANTZ, P. J.: Serotypes of *Escherichia coli* associated with colibacillosis in neonatal animals. Ann. N. Y. Acad. Sci., 176, 1971, s. 67-79.
- GLAUSER, M. — ISLIKER, H.: Purification spécifique d'anticorps antilymphocytaires. Annls Inst. Pasteur, Paris, 120, 1971, s. 759-766.
- GUINÉE, P. A. M. — AGTERBERG, C. M. — JANSEN, W. H.: *Escherichia coli* 0-antigen typing by means of mechanized microtechnique. Appl. Microbiol., 24, 1972, č. 2, s. 127-131.
- KASHIWAZAKI, M. — NAMIOKA, S.: 0-antibody levels to *Escherichia coli* in pigs. Cornell Vet., 59, 1969, s. 611-621.
- KAUFFMANN, F.: The serology of the coli group. J. Immun., 57, 1947, s. 71-100.
- KUNIN, C. M. — BEARD, M. V. — HALMAGYI, N. E.: Evidence for a common hapten associated with endotoxin fractions of *E. coli* and other *Enterobacteriaceae*. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 111, 1962, s. 160-166.
- SALAJKA, E.: Studies on immune response in pigs with regard to immunoprophylaxis of some herd infection. I. *Escherichia coli* infections in new-born piglets. Docum. vet., Brno, 6, 1967, s. 199-209.
- SOJKA, W. J. — ERSKINE, R. G. — LLOYD, M. K.: Haemolytic *Esch. coli* and „oedema disease“ of pigs. Vet. Rec., 69, 1957, s. 293-301.
- SOJKA, W. J.: *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Buks, England. 1965.
- WRAMBY, G.: Investigations into the antigenic structure of *Bact. coli* isolated from calves. Acta path. microbiol. scand., 76, 1948, s. 76-159.

Došlo dne 12. 6. 1975

SALAJKA E., ŠARMANOVÁ Z., HORNICHOVÁ A. (Naучно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Специфичность диагностических сывороток для определения 0-антигенов *E. coli* агглютинацией. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 633-644, 1975.

Сыворотка кроликов, иммунизированных 0-антигенами типовых культур *E. coli*, агглютинировала в ряде случаев, помимо гомологичного антигена, еще другие 0-антигены *E. coli*. Из серии сывороток против 151 0-антигену *E. coli* была установлена моноспецифичность лишь у 73 сывороток. Остальные сыворотки не были моноспецифическими. У 34 сывороток была установлена реактивность с большим числом (15—113) 0-антигенов. При иммунизации 2—3 кроликов одинаковым 0-антигеном были получены сыворотки, которые помимо гомологичного антигена агглютинировали разное число других 0-антигенов. У сывороток с нежелательной агглютинационной активностью к большему числу других 0-антигенов оправдала себя абсорбция 0-антигеном гетерологичного штамма *E. coli*, который также вызвал продукцию широкого спектра агглютининов к другим 0-антигенам. Поливалентная сыворотка, полученная смешиванием нескольких сывороток моновалентных, не оправдала себя. Типовые 0-антигены агглютинировались также теми поливалентными сыворотками, куда не включались ни гомологичная, ни перекрестно реагирующая сыворотки.

(0-антигены; перекрестное родство; антисыворотка; неспецифическая активность; абсорбция

SALAJKA E., ŠARMANOVÁ Z., HORNICHOVÁ A. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). The Specificity of the Diagnostic Serums for the Agglutination Determination of *E. coli* 0-Antigens. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 633-644, 1975.

The serums of rabbits immunized by the 0-antigens of the *E. coli* test strains agglutinated, in frequent cases, not only the homologous antigen but also other 0-antigens of *E. coli*. In the whole set of serums against 151 0-antigens of *E. coli*, monospecificity was found only in 73 serums. Other serums were not monospecific. Thirty-four serums showed reactivity with a greater number of 0-antigens (15 to

113). The immunization of two or three rabbits with the same 0-antigen provided serums which agglutinated different numbers of other 0-antigens besides the homologous antigen. In the serums with an undesirable agglutinating activity against a greater number of other 0-antigens, good results were obtained by the 0-antigen absorption of the heterologous *E. coli* strain which also evoked the production of a wide spectrum of agglutinines against other 0-antigens. The polyvalent serums obtained by the mixing of several monovalent serums did not prove suitable. The test 0-antigens were agglutinated even by a polyvalent serum set comprising neither a homologous nor a cross-reacting serum.

0-antigens; cross-relationship; antiserums; non-specific activity; absorption

SALAJKA E., ŠARMANOVÁ Z., HORNICHOVÁ A. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Spezifität der diagnostischen Seren zur Bestimmung der E. coli 0-Antigene durch Agglutination*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 633-644, 1975.

Die mit 0-Antigen von *E. coli*-Typenkulturen gewonnenen Kaninchenserum agglutinierten in zahlreichen Fällen außer dem homologen Antigen noch andere *E. coli*-0-Antigene. Bei einer Reihe von Seren gegen 151 *E. coli*-0-Antigene wurde eine Monospezifität nur bei 73 Seren festgestellt. Die übrigen Seren waren nicht monospezifisch. Bei 34 Seren wurde eine Reaktivität mit einer größeren 0-Antigenanzahl (15 bis 113) festgestellt. Bei der Immunisierung von zwei oder drei Kaninchen mit dem gleichen 0-Antigen wurden Seren gewonnen, die außer dem homologen Antigen eine ungleiche Anzahl anderer 0-Antigene agglutinierten. Bei Seren mit unerwünschter Agglutinationsaktivität gegen eine größere Anzahl anderer 0-Antigene bewährte sich die Absättigung mit dem 0-Antigen eines heterologen *E. coli*-Stammes, der auch die Produktion eines breiten Spektrums von Agglutininen gegen andere 0-Antigene auslöste. Die durch Vermischen einiger monovalenten Seren gewonnenen polyvalenten Seren haben sich nicht bewährt. Die Typen-0-Antigene wurden auch mit jenen polyvalenten Seren agglutiniert, in welche weder homologes noch kreuzweise reagierendes Serum eingereiht wurde.

0-Antigene; gekreuzte Verwandtschaft; Antiseren; nichtspezifische Aktivität; Absättigung

Adresa autorů:

MVDr. E. Salajka, CSc., RNDr. Z. Šarmanová, A. Hornichová, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

0-ANTIGENY KMENŮ *ESCHERICHIA COLI* Z TELAT STIŽENÝCH PRŮJMEM V RANÉM POSTNATÁLNÍM OBDOBÍ

E. Salajka, Z. Šarmanová, M. Hornich, L. Ulmann

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

SALAJKA E., ŠARMANOVÁ Z., HORNICH M., ULMANN L. 0-antigeny kmenů *Escherichia coli* z telat stížených průjemem v raném postnatálním období. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 645-658, 1975.

Byla provedena typizace 0-antigenů bakterií *Escherichia coli* izolovaných z 2356 telat trpících průjmy v raném postnatálním období. Tento soubor vyšetřených zvířat byl rozdělen na dvě skupiny. První skupinu tvořila telata s bakteriemií. Zahrnovala 288 telat, u nichž byly bakterie *E. coli* izolovány z jater. Ve druhé skupině byla telata stížená diarrhoeou bez bakteriemií; bylo v ní zařazeno 2068 telat. Při použití 79 monovalentních sér pro typizaci 0-antigenů *E. coli* bylo u vyšetřovaných telat zjištěno několik 0-séroskopin *E. coli*, které výrazně převládaly nad ostatními séroskopinami. U kmenů *E. coli* ve skupině telat s bakteriemií byl nejčastější nález antigenů 078 (23,6 %), 015 (21,5 %), 0101 (13,5 %) a 08 (4,9 %). Ve skupině telat trpících diarrhoeou bez bakteriemií vykazovaly nejvyšší frekvenci *E. coli* s antigeny 0101 (14,8 %), 09 (12,5 %), 08 (6,9 %), 08+0141 (5,4 %) a 0117 (5,1 %).

telata; *Escherichia coli*; 0-antigeny; bakteriemií; diarrhoické koliinfekce

Nejčastější onemocnění telat v novorozeneckém období představují průjmy, které se v řadě chovů vyznačují značnou mortalitou. Autoři uvádějící výskyt průjmů hlavně u telat uměle napájených předpokládají, že k jejich vzniku dochází v důsledku chyb v ustájení, ošetrování a ve výživě, a onemocnění označili pojmem dyspepsie (P o d k o p a j e v a Š i š k o v, 1967). Avšak enzootický výskyt onemocnění i u telat sajících u vlastních matek v chovech s dobrou chovatelskou úrovní, kde jsou vyloučeny poruchy ve výživě, podporuje názor, že velká část případů má etiologii infekční. Kromě případů, kdy je průjem doprovodným symptomem onemocnění celkových (septických a viremických), nebo onemocnění lokalizovaných v dýchacích orgánech, je hlavně projevem infekčního onemocnění lokalizovaného jen v trávicím traktu. Kromě méně početných údajů uvádějících u průjmů jako etiologické agens viry a chlamydia, byla publikována řada prací uvádějících průjmy u novorozenečích telat v souvislosti s infekcí bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*, a z nich hlavně s *Escherichia coli*.

Koliinfekce telat, v zahraniční literatuře označované pojmem koli-bacilózy a v západní také „white scour“ (bílý průjem), mají mezi infekčními chorobami zvláštní postavení, jelikož obvykle jsou k nim zahrnovány dvě nozologické jednotky: a) generalizovaná (septikemická) forma,

vyvolávaná tzv. invazními kmeny *E. coli*, které nejsou enteropatogenní; b) enterální forma, která je vyvolávána kmeny enteropatogenními, neinvazivními.

Septikemická forma, doprovázená průjmy jen u části případů, je pravidelným důsledkem odeprání kolostra novorozeným telatům. Experimentálně byla opětovně vyvolána u agamaglobulinemických telat aplikací invazivních kmenů *E. coli* (Fey a Margadantová, 1962, Smith a Hallsová, 1968). U telat normoglobulinemických se její vyvolání nedaří. Přirozeně se vyskytující případy kolisepsí u telat jsou podmíněny opomenutým či opožděným podáním kolostra nebo jsou důsledkem neschopnosti některých telat resorbovat imunoglobuliny z přijatého kolostra.

Enterální forma se vyskytuje u telat s normálním obsahem gamaglobulinů v krvi. Údaje o experimentálním vyvolání tohoto typu onemocnění jsou poměrně vzácné (Smith a Hallsová, 1967 a Salajka a Gilka, 1968). Salajka a Gilka prokázali, že jeho vznik souvisí s nepřítomností specifických protilátek proti kapsulárním antigenům enteropatogenních kmenů *E. coli* v kolostru krav a odtud pak i v místě infekce, tj. v lumen střeva. Onemocnění lze zabránit opakovaným přísunem protilátek buď ve formě kolostra od imunizovaných matek nebo ve formě specifického hyperimunního séra (Salajka aj., 1970).

Klasifikace *E. coli* je založena na fermentativních vlastnostech a na sérologickém vyšetření jejich antigenních komponent, které v současné době zahrnují 151 somatický O-antigen (označeny čísla O1–O157; z této řady bylo 6 zástupců vyloučeno), 93 kapsulární nebo obalové K-antigeny (K1–K93) a 52 flagelární H-antigeny (H1–H52). Při možnosti různých kombinací zatím evidovaných antigenů existuje tedy velký počet rozdílných sérotypů *E. coli*. Avšak jen relativně malý podíl je uváděn v souvislosti s výskytem koliinfekcí u člověka a hospodářských zvířat. Práce zaměřené na typizaci kmenů *E. coli* ukazují, že patogenní sérotypy se vyznačují druhovou specifitou, takže sérotypy známé z případů koliinfekcí lidí nejsou běžné u nemocných zvířat a podobně sérotypy zjišťované u koliinfekcí selat nejsou nalézány u nemocných telat či drůbeže.

Samotná sérotypizace *E. coli* zahrnující určení tří uvedených typů antigenů (O, K a H) není však dostačujícím kritériem pro rozhodnutí, že kmeny *E. coli*, které podle antigenů přísluší k séroskupinám či sérotypům označovaným za patogenní, skutečně patogenní jsou. Určované antigeny nejsou totiž současně toxickými substancemi a genetické determinanty pro toxicitu nesouvisejí, až na některé výjimky, s genetickými determinanty pro uvedené antigeny. Je zde tedy možnost, že při sérotypizaci mohou být i nepatogenní kmeny *E. coli* zařazeny do stejných séroskupin či sérotypů jako kmeny patogenní.

Kromě průkazu toxicity enteropatogenních *Escherichii* nejsou v současné době vypracovány vhodné testy pro přesnou diferenciaci patogenních a nepatogenních kmenů.

Objektivní diferenciaci dětských enteropatogenních kmenů *E. coli* od nepatogenních se datuje od r. 1956, kdy De aj. využili k tomuto účelu testu dilatace podvázaných střevních kliček u králíků, do nichž byly aplikovány zkoušené kultury bakterií. Tento test zavedli v r. 1953 De a Chatterje pro průkaz enteropatogenity *Vibria cholerae*. Patogenní kmeny způsobovaly hypersekreci tekutiny a elektrolytů do lumina

střevního, což se projevovalo dilatací podvázaného úseku střeva. Kmeny nepatogenních vibrií tuto reakci nevyvolávaly. Smith a Hallsová (1967) prokázali, že pro průkaz enteropatogenity kmenů *E. coli* izolovaných z mláďat hospodářských zvířat trpících průjemem nejsou vhodné králíci, ale selata pro kmeny izolované ze selat a telata pro kmeny izolované z telat. Produkce tekutiny do lumina podvázané kličky střevní může být vyvolána buď živou kulturou enteropatogenního kmene nebo bezbuněčným filtrátem stejné kultury. Toxická substance, odpovědná za tuto reakci, byla označena pojmem enterotoxin. Produkce enterotoxinu je tedy charakteristickou vlastností, kterou se odlišují kmeny enteropatogenní od kmenů saprofytických a od tzv. kmenů invazních, které se účastní na vzniku stavů septických.

Dnes je u *E. coli* popsáno více typů enterotoxinů. Jejich produkce je podmíněna plazmidy, tj. extrachromozomálními přenosnými genetickými faktory (Smith a Hallsová, 1968, Smith a Linggood, 1971, 1972). V poslední době se objevují práce, v nichž pro průkaz enterotoxinu jsou využívány tkáňové kultury.

Jelikož testy pro průkaz enteropatogenity jsou značně náročné a jsou používány jen na pracovištích úzce specializovaných, zůstává nadále sérotypizace jedním z prvních kroků pro diferenciaci patogenních kmenů *E. coli*, ať již pro účely diagnostické nebo epizootologické, či pro studia zaměřená na specifickou prevenci a léčbu koliinfekcí. Pravidelnost kombinací O- a K-antigenů u dětských tzv. dyspeptických typů *E. coli* umožňuje používání OK sér pro rutinní vyšetřování kmenů *E. coli* ze stolice dětí. U kmenů *E. coli* z případů koliinfekcí selat a telat však tato pravidelnost není, kromě kmenů séro skupiny O78 : K80(B), které jsou etiologickým agens u septických forem koliinfekcí telat a jehňat, a několika sérotypů vyvolávajících enterální afekce u selat.

Prvním základním stupněm diferenciací kmenů *E. coli* podezřelých z patogenity pro hospodářská zvířata nadále zůstává určení O-antigenů. Dosud publikované práce, zaměřené na typizaci kmenů *E. coli* z případů koliinfekcí u telat, se vyznačují tím, že jsou zaměřeny hlavně na septickou formu a jen ojediněle na formu enterální (Fey, 1973). Přehled těchto údajů je shrnut v tab. I.

Náplní vlastní práce byla sérologická typizace O-antigenů kmenů *E. coli* izolovaných z telat stížených průjemem v raném postnatálním období, a to hlavně z hromadných výskytů onemocnění ve velkochovech skotu v ČSSR. Kultivačním vyšetřením parenchymatózních orgánů a střev byla vyloučena zvířata stížená jinými bakteriálními infekcemi. Další diferenciací s ohledem na etiologii onemocnění nebyla prováděna. Byl postaven předpoklad, že ne ve všech, ale v řadě případů, se jako etiologické agens průjmu uplatnily patogenní typy bakterií *E. coli* a že sérotypizace může ukázat, které séro skupiny *E. coli* připadají v úvahu jako suspektní vyvolavatelé koliinfekcí u telat v ČSSR.

MATERIÁL A METODA

KMENY *E. COLI*

Kmeny *E. coli* byly izolovány v letech 1961 až 1974 z 2356 telat trpících průjemem v raném postnatálním období. Telata pocházela z 302 lokalit různých oblastí ČSSR. Menší část kmenů byla získána z několika diagnostických laboratorí Státního

I. Údaje různých autorů o výskytu séro skupin *E. coli* (podle 0-antigenů) u kolinfekcí telat

Autor	Vyšetřeno kmenů nebo případů	Onemocnění	Séroskopiny — počet — frekvence v %												
WRAMBY, 1948, Švédsko	1167	septické	séroskop. ks %	015 214 18,3	08 137 11,7	09 109 9,3	0117 97 8,3	078 54 4,6	045 53 4,5	0115 49 4,2	018 29 2,5	jiné 421	ne-urč. 4		
BOKHARI a ØSKOV, 1952, Švédsko	155	septické	séroskop. ks	078 18	015 15	0115 10	0117 6	08 6	09 6	045 5	026 4	jiné 21	ne-urč. 64		
ULBRICH, 1954, NDR	78	střevní a septické	séroskop. ks	09 9	08 7	078 6	04 4	07 4	jiné 11	ne-urč. 37					
FEY, 1957a, Švýcarsko	105	septické	séroskop. ks %	078 29 27,6	0115 15 14,3	086 10 9,5	015 8 7,6	0117 8 7,6	jiné 31	ne-urč. 4					
FEY, 1957b, Švýcarsko	154	septické	séroskop. ks %	078 55 35,7	jiné než 078 99 64,3										
REES, 1958, V. Británie	129	střevní a septické	séroskop. ks	078 15	0137 7	09 4	035 4	015 2	086 2	0117 1	jiné 5	ne-urč. 89			
KAECKENBEECK a THOMAS, 1960, Belgie	278	septické	séroskop. ks	078 55	055 50	086 28	015 20	088 9	023 6	020 5	jiné 47	ne-urč. 58			

1. pokračování tabulky I

pokračování tabulky I

Autor	Vyšetřeno kmenů nebo případů	Onemocnění	Séroskopiny — počet — frekvence v %															
DAM, 1960, Dánsko	431	septické	séroskop. ks %	078 185 42,9	0115 61 14,2	015 20 4,6	088 12 2,8	045 11 2,6	0117 10 2,3	0114 7 1,6	093 5 1,2	034 5 1,2	068 5 1,2	jiné 7 1,6	ne-urč. 103 23,9			
GOSSLING aj., 1964, Kanada	265	střevní a septické	séroskop. ks	09 45	0101 29	015 26	017 19	0115 13	0119 11	020 10	08 9	jiné 29	ne-urč. 74					
WILLINGER a MATHOIS, 1965, Rakousko	120	septické	séroskop. ks	078 28	09 4	015 4	045 2	026 1	086 1	0101 1	0115 1	jiné 36	ne-urč. 42					
SALAJKA, 1966, ČSSR	468	střevní	séroskop. ks %	0101 104 22,3	09 61 13,0	08+ 0141 42 9,0	08 31 6,7	015 24 5,1	024 16 3,4	073 15 3,2	0117 13 2,8	jiné 130 27,7	ne-urč. 32 6,8					
SALAJKA, 1966, ČSSR	202	septické	séroskop. ks %	0101 39 19,4	078 30 14,9	08 14 7,0	015 12 5,9	0141 11 5,5	09 9 4,5	024 9 4,5	020 8 3,9	0115 8 3,9	08+ 0141 7 3,4	0119 6 2,9	jiné 40 19,8	ne-urč. 9 4,5		
YALCIN aj., 1969, Francie	769	septické	séroskop. ks %	078 106 26,5	08 63 15,7	0117 52 13,0	011 44 11,0	09 23 5,7	0140 23 5,7	017 21 5,7	0115 20 5,0	035 16 4,0	082 11 2,7	0141 11 2,7	0133 8 2,0	026 2 0,5	jiné 0	ne-urč. 369*
VALLÉE aj., 1970, Francie	216	střevní a septické	séroskop. ks %	08 20 13,0	09 17 11,1	0101 14 9,9	011 12 7,8	020 11 7,1	086 9 5,8	021 7 4,57	0143 7 4,57	0145 7 4,57	068 5 3,2	0118 5 3,2	078 3 1,96	0123 3 1,96	jiné 47	ne-urč. 48*

pokračování

pokračování

Autor	Vyšetřeno kmenů nebo případů	Onemocnění	Séroskupiny — počet — frekvence v %												
GLANTZ, 1971, USA	51	střevní	séroskup. 02a 09 ks 33 18												
GLANTZ, 1971, USA	226	septické	séroskup. 015 0101 017 075 088 0115 055 08 026 0117 078 jiné ks 22 20 14 12 12 12 10 8 8 8 2 98												
POHL a THOMAS, 1972, Belgie	560	septické	séroskup. 078 015 08 020 086 055 jiné ne- ks 53 29 16 14 19 13 130 286 urč. % 9,0 4,0 3,0 3,0 3,0 2,0 25,0 51,0												
MURPHY, 1973, Irsko	50	septické	séroskup. 078 0119 08 011 015 026 jiné ks 13 7 6 4 4 2 14												
MURPHY, 1973, Irsko	46	střevní	séroskup. 08 09 0119 026 VLA VLA VLA ks 6 4 4 3 3 2 2 1 21												
SCHOENAERS a KAECKENBEECK, 1974, Belgie	555	septické	séroskup. 078 055 086 0117 015 08 088 0114 020 025 0137 jiné ne- ks 85 36 25 17 16 12 8 8 7 6 5 87 urč. % 27,2 11,5 8,0 5,4 5,1 3,8 2,5 2,5 2,2 1,9 1,6 243*												
RAŠKA aj., 1974, ČSSR	neudáno	střevní a septické	séroskup. 08, 09, 020, 035, 026, 055, 064, 069, 078, 086, 0101, 0105, 0111** séroskup. 0115, 0119, 0125, 0128, 0131, 0141, 0137, 0114, 0139, NT												

* = % počítáno jen z určených

** = početní zastoupení v jednotlivých séroskupinách neudáno

veterinárního ústavu a z Biovety, n. p., v Ivanovicích na Haně. Většina kmenů byla izolována na vlastním pracovišti:

a) převážně z kadaverů telat, u nichž byly bakteriologicky vyšetřovány parenchymatózní orgány (játra, slezina, ledvina) a povrch sliznice tenkého a tlustého střeva;

b) v menší části případů z rektálních výtěrů telat, která se uzdravila po perorální aplikaci chemoterapeutik, antibiotik nebo biopreparátů. U těchto telat se vzorky odebíraly většinou před začátkem léčby.

Z porostů *E. coli* ze vzorků trusu a z kadaverů vyšetřovaných na vlastním pracovišti bylo z každého zvířete zařazeno pro sérotypizaci po třech až deseti kmenech, takže v rámci této práce byly sérologicky vyšetřeny 0-antigeny u více než 6000 kmenů *E. coli*. Kultury *E. coli* byly udržovány na Dorsetově vaječné půdě. Jelikož v převážné většině případů byly kmeny *E. coli* izolované z jednoho zvířete zařazeny do stejné séroskupiny, bylo v konečném vyhodnocení každé zvíře reprezentováno pouze jedním kmenem *E. coli*.

Při hodnocení výsledků byl vyšetřovaný soubor kmenů *E. coli* rozdělen na dvě skupiny. V první skupině byly kmeny ze zvířat s bakteriemií (kmeny izolované z jater kadaverů). Sem byly zařazeny kmeny z 288 telat, získané převážně z diagnostických pracovišť SVÚ a z Biovety, n. p., v Ivanovicích na Haně. Ve druhé skupině byly kmeny *E. coli* z 2068 kusů telat trpících diarrhoeou bez bakteriémie.

DIAGNOSTICKÁ SÉRA

Sada 79 monovalentních sér připravených imunizací králíků 0-antigeny typových kultur *Escherichia coli* z International Escherichia Centre v Kodani, získaných prostřednictvím Čs. sbírky mikroorganismů, byla rozdělena na dvě skupiny. Do první skupiny byla zařazena séra proti 0-antigenům séroskupin *E. coli* uváděných v souvislosti s koliinfekcí u zvířat. V této skupině byla 44 séra proti následujícím 0-antigenům: 02, 03, 08, 08+0141, 09, 010, 013, 015, 021, 023, 024, 035, 041, 045ac, 049, 064, 069, 073, 076, 077, 078, 083, 088, 0101, 0102, 0103, 0108, 0109, 0115, 0116, 0117, 0119, 0133, 0135, 0137, 0138, 0139, 0140, 0141, 0147, 0149, 0150 a 0157.

Druhou skupinu tvořilo 35 sér pro určování 0-antigenů *E. coli*, udávaných v současné době za patogenní pro člověka: 01, 04, 06, 07, 018ab, 020, 022, 025, 026, 028, 044, 051, 055, 075, 086, 0111, 0112ac, 0114, 0124, 0125, 0126, 0127, 0128, 0136, 0142, 0143, 0144, 0145, 0148, 0151, 0152, 0153, 0154, 0155 a 0156.

PŘÍPRAVA ANTIGENŮ

Bujónové kultury vyšetřovaných kmenů *E. coli*, vyrostlé během 18hodinové inkubace při teplotě 37 °C, byly po dobu dvou hodin autoklávovány při teplotě 121 °C za účelem rozrušení K-antigenů. Po vychladnutí byly konzervovány přidavkem 10% vodné suspenze fenolu na konečnou koncentraci 0,5 % fenolu. Pak byly nefelometricky upraveny na hustotu 0,5 miliardy bakteriálních buněk v 1 ml.

SÉROLOGICKÉ URČENÍ 0-ANTIGENŮ AGLUTINACÍ

0-antigeny vyšetřovaných kmenů *E. coli* byly typizovány pomalou aglutinací ve zkumavkách tak, že nejprve bylo provedeno vyšetření se séry první skupiny, tj. se séry proti 0-antigenům známých a suspektních zvířecích patogenů. Kmeny *E. coli* s touto řadou sér nezařazené byly pak dále vyšetřovány se séry druhé skupiny, tj. proti humánním patogenům.

Každé sérum bylo používáno jen v jednom předem prověřeném pracovním ředění (aglutinace metodou jedné zkumavky) tak, že do řady zkumavek obsahujících 0,1 ml zředěného séra byly přidávány jednotlivé antigeny v množství 0,5 ml. Po 18hodinové inkubaci v termostatu při teplotě 37 °C byly posuzovány aglutinační reakce. Při hodnocení výsledků byla brána v úvahu specifita používaných sér, jak byla popsána v prvním dílu tohoto souboru prací (Sala jka aj., 1975).

VÝSLEDKY

Kmeny *E. coli* z 288 telat s bakteriemií byly určeny v 97,6 % případů a zařazeny do 33 O-skupin (tab. II). Nezařazeno zůstalo sedm případů (2,4 %). Ve 14 O-skupinách byla frekvence vyšší než 1 % a byly k nim zařazeny 253 případy, tj. 87,8 %. Podle klesající frekvence to byly tyto O-antigeny: 078, 015, 0101, 08, 0141, 09 024, 0115, 020, 08 + 0141, 0119, 06, 086 a 0117. Počet zařazených případů do jednotlivých O-skupin ukázal na výraznou dominanci tří O-skupin nad séroskupinami ostatními. Do těchto tří skupin (078, 015 a 0101) příslušely kmeny *E. coli* z 57,7 % případů.

II. O-antigeny kmenů *Escherichia coli* z jater 288 telat s bakteriemií

Antigen	ks	%	Antigen	ks	%
01	2	0,69	073	2	0,69
02	2	0,69	077	1	0,35
04	1	0,35	078	68	23,61
06	5	1,73	086	4	1,38
08+0141	7	2,43	088	1	0,35
08	14	4,86	0101	39	13,54
09	9	3,12	0108	1	0,35
011	1	0,35	0111	1	0,35
013	2	0,69	0112ac	1	0,35
015	62	21,52	0114	2	0,69
020	8	2,77	0115	8	2,77
021	1	0,35	0117	3	1,04
024	9	3,12	0119	6	2,08
026	2	0,69	0139	2	0,69
035	1	0,35	0141	11	3,81
041	2	0,69	komb.	1	0,35
055	2	0,69	neurč.	7	2,43
Celkem			288		

O-antigeny kmenů *E. coli* z 2068 telat stížených diarrhoeou bez bakteriemií byly určeny v 1517 případech (73,4 %) a zařazeny do 68 séroskupin (tab. III). Kmeny *E. coli* z 551 telete (26,6 %) zůstaly nezařazené pro příslušnost k jiným neurčovaným séroskupinám nebo pro růstovou R-formu. V patnácti O-skupinách byla frekvence vyšší než 1 % a byly sem zařazeny kmeny *E. coli* z 1232 telat (59,54 %). Kmeny ze zbývajících 285 telat (13,86 %) byly rozvrstveny v dalších 53 séroskupinách. Zastoupení jednotlivých O-skupin z uvedených patnácti početnějších podle klesající frekvence výskytu bylo toto:

III. 0-antigeny kmenů *Escherichia coli* ze střev 2068 telat stižených průjmem bez bakteriémie

Antigen	ks	%	Antigen	ks	%	Antigen	ks	%
01	5	0,24	045ac	10	0,48	0125	5	0,24
02	19	0,92	049	3	0,14	0126	3	0,14
03	5	0,24	055	6	0,29	0127	5	0,24
04	23	1,11	064	2	0,09	0128	1	0,04
06	9	0,43	069	11	0,53	0133	4	0,19
07	14	0,67	073	23	1,11	0135	2	0,09
08	142	6,87	075	3	0,14	0138	7	0,33
08 + 0141	112	5,42	076	6	0,29	0139	3	0,14
09	259	12,52	077	9	0,43	0140	3	0,14
010	4	0,19	083	3	0,14	0141	39	1,88
011	48	2,32	086	22	1,06	0142	1	0,04
013	5	0,24	088	2	0,09	0143	5	0,24
015	62	2,99	0101	307	14,84	0147	6	0,29
020	23	1,11	0102	2	0,09	0149	4	0,19
021	6	0,29	0103	5	0,24	0150	3	0,14
022	2	0,09	0108	11	0,53	0151	1	0,04
023	22	1,06	0109	2	0,09	0152	1	0,04
024	1	0,04	0111	7	0,33	0153	1	0,04
025	4	0,19	0112ac	10	0,48	0155	1	0,04
026	21	1,01	0114	4	0,19	komb.	10	0,48
028	2	0,09	0115	6	0,29	neurč.	440	21,28
035	6	0,29	0116	13	0,62	R-formy	111	5,36
041	20	0,96	0117	105	5,08	Celkem: 2068		
044	2	0,09	0119	24	1,16			

0101 — 307 ks — 14,84 %	0119 — 24 ks — 1,16 %
09 — 259 ks — 12,52 %	073 — 23 ks — 1,11 %
08 — 142 ks — 6,87 %	020 — 23 ks — 1,11 %
08 + 0141 — 112 ks — 5,42 %	04 — 23 ks — 1,11 %
0117 — 105 ks — 5,08 %	086 — 22 ks — 1,06 %
015 — 62 ks — 2,99 %	023 — 22 ks — 1,06 %
011 — 48 ks — 2,32 %	026 — 21 ks — 1,01 %
0141 — 39 ks — 1,88 %	

Prvních pět skupin (0101, 09, 08, 08 + 0141 a 0117), do nichž bylo zařazeno po více než 5 % případů, zahrnuje kmeny *E. coli* z 925 telat (44,73 %).

IV. 0-antigeny u *E. coli* z telat ve 12 lokalitách s enzootickým výskytem průjmů v raném postnatálním období

Antigen	Lokalita											Celkem	
	Blučina 1963–64	Bratčice 1962–64	Krumvíř 1962	Křepice 1964–65	M. N. Ves 1968–69	Mournice 1966–67	Nosilav 1971–72	Sasov 1973–74	Troubsko 1965–66	V. Němčice 1963	Vojkovice 1964		
												ks	%
02	1		4	1				1				7	1,55
03			1	2								3	0,66
04	1				4							5	1,12
08	2	9	6	3	1	4	5	6			1	37	8,17
08+0141		28	1			1	12	1			1	44	9,72
09		7			9		7	9	1	11	11	61	11,26
011	1	1			2	1		2		2		9	1,99
015	1	1	1		2	1		3		1		14	3,09
020						1						3	0,88
041	3			1	1	1	1					7	1,55
045ac								3				3	0,66
077				4								4	0,88
086					6							6	1,33
0101	20	11	4	32	4	4	2	21	11		1	115	25,39
0116					1			2				3	0,66
0117	1	3					11	5	2		1	23	5,08
0119								3				4	0,88
0141	1				1			1				5	1,11
jiné	4	5		5	3	2	2	1	1	1	1	28	6,18
neurč.	1	2		1	11	1	2	28				53	11,70
R-formy	4	3	2	4		2	1	1		1		18	4,00
Vyšetřeno zvířat	40	70	19	53	45	18	43	87	15	16	16	453	

Vyhodnocení 12 lokalit s enzootickým výskytem průjmů u telat, v nichž bylo vyšetřeno po patnácti a více telatech, ukázalo rovněž na převažující výskyt kmenů *E. coli* uvedených pěti séro skupin (tab. IV). Ze 453 sem zařazených telat byly kmeny *E. coli* těchto pěti séro skupin prokázány u 280 telat (59,62 %).

Dosažené výsledky typizace O-antigenů vyšetřovaného souboru kmenů *E. coli* z telat s průjmy jsou se zahraničními údaji dobře srovnatelné pouze v případech kolisepsi. Srovnání vlastního zjištění nejfrekventovanějších 14 séro skupin *E. coli* s údaji v tab. I ukazuje na velmi častý výskyt kmenů stejných séro skupin i v jiných zemích. Z těchto zjištění lze usuzovat, že v uváděných O-skupinách jsou zařazeny kmeny *E. coli* invazivní pro telata. Zatím však vlastnost invazivity byla prokázána jen u kmenů *E. coli* séro skupiny O78 (Fey a Margadantová, 1962). O dalších, zvláště početných O-skupinách lze předpokládat, že rovněž mohou zahrnovat invazivní kmeny. Je však třeba brát v úvahu, že v řadě případů mohlo dojít v parenchymatózních orgánech telat k pomnožení kmenů *E. coli* proniknuvších ze střeva v agonálním či postmortálním stadiu, takže ve vyšetřovaném souboru je i část kmenů *E. coli* saprofytických nebo enteropatogenních. Diferenciace invazivních kmenů *E. coli* schopných vyvolávat typické sepse je sice možná na bezkolostrálních telatech, ale tato metoda je velmi nákladná a pokud nejsou k dispozici gnotobiotická zvířata, je těžce realizovatelná pro nebezpečí infekce jinými než zkoušenými kmeny *E. coli*. Pro diferenciaci invazivních kmenů *E. coli* tedy zatím není adekvátní metoda, kterou by bylo možné vyšetřit větší počet suspektních kmenů a pomocí ní rozhodnout o dalších séro skupinách, zahrnujících kmeny s těmito vlastnostmi.

Soubor vyšetřovaných kmenů *E. coli* z 2068 telat s průjmy bez bakteriémie představuje výsledky, které lze jen částečně srovnat s údaji z jiných zemí. Dosud bylo publikováno pouze šest prací, uvádějících velmi skrovné výsledky sérotypizace kmenů *E. coli* z telat s průjmy (tab. I). Čtyři z těchto prací (Ulbrich, 1954, Rees, 1958, Gossling aj., 1964, Vallee aj., 1970) uvádějí výsledky, v nichž není rozlišována bakteriémie od infekce lokalizované ve středním traktu. Pouze ve dvou pracích (Glantz, 1971 a Murphy, 1973) je uveden výsledek typizace malého počtu kmenů *E. coli* z diarrhoických případů. Séro skupiny s vysokou frekvencí výskytu, zjištěné ve vlastním souboru (O101, O9, O8, O117), jsou uváděny i citovanými autory.

Vlastní výsledky typizace kmenů *E. coli* z telat s průjmy, zahrnující z velké části diarrhoické kolinfekce, jsou tedy při srovnání s dosavadními literárními údaji ojedinělé. Je to snad dáno zvláštnostmi chovu skotu v ČSSR, což se týká hlavně velikosti jeho stád chovaných stájově a dále rasově podmíněnou vnímavostí k diarrhoickým kolinfekcím.

Na zvláštnost opomíjení enterálních kolinfekcí u telat upozorňuje Gay (1971), když píše, že většina studií o sérologické typizaci *E. coli* izolovaných z kolibacilózy u telat se zabývá koliseptikémií, ačkoli u selat je průkazně potvrzena souvislost určitých sérotypů *E. coli* s enterální kolibacilózou. Tentýž autor uvádí předpoklad, že v dohledné době bude potvrzena možnost prevence onemocnění vakcínací, jelikož typově specifické protilátky (hlavně OK) se uplatňují v protekci proti enterální formě onemocnění, hlavně pokud účinkují lokálně.

V poslední době se objevují údaje o výskytu enterální formy kolinfekcí i v zahraničí. Tak Newman aj. (1973) v práci o úspěšné ochraně telat před experimentální diarrhoickou formou kolinfekcí vakci-

nací březích matek uvádějí, že enterální forma kolibacilózy v USA zachvátí více než 50 % novorozených telat ve stádě, takže běžný úhyn pak činí 10 až 20 %.

I když je nutno brát v úvahu, že zdaleka ne všechna v této práci vyšetřovaná telata byla stížena průměrným vyvolaným enteropatogenními typy *E. coli*, je možné předpokládat, že séro skupiny vykazující vysokou frekvenci zahrnují typy enteropatogenní. Tento předpoklad byl potvrzen v testech enteropatogenity na podvázaných kličkách střevních (Salačka aj., 1970), které daly pozitivní výsledky právě u řady kmenů *E. coli* séro skupin O101, O9 a O8 + O141. Kmeny *E. coli* těchto séro skupin byly časté i v lokalitách uvedených v tab. IV, v nichž vlastně představovaly stájovou infekci. Údaje v této tabulce ukazují na nutnost vyšetření většího počtu zvířat s průjmy, hlavně v případech snahy o přípravu stájové vakcíny.

Literatura

- BOKHARI, S. M. H. — ØRSKOV, F.: O-grouping of *E. coli* strains isolated from cases of white scour. Acta path. microbiol. scand., 30, 1952, s. 87-89.
- DAM, A.: Serological O-grouping of strains of *E. coli* isolated from cases of coli septicæmia in calves. Nord. VetMed., 12, 1960, s. 321-342.
- DE, S. N. — BHATTACHARYA, K. — SARKAR, J. K.: A study of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. J. Path., 71, 1956, s. 201.
- DE, S. N. — CHATTERJE, D. N.: An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. J. Path., 66, 1953, s. 559.
- FEY, H.: Bakteriologie und Serologie der Colisepsis des Kalbes. I. Serologische und biochemische Untersuchungen. II. Die Bedeutung des Colityps 78 : 80B für die Kälberruhr. Zentbl. VetMed., 4, 1957, s. 309-318; 447-458.
- FEY, H.: Colibacillosis in calves. Hans Huber Publishers, Bern 1973. 147 s.
- FEY, H. — MARGADANT, A.: Zur Pathogenese der Kälber-Colisepsis. IV. Agammaglobulinämie als disponierender Faktor. Zentbl. VetMed., 9, 1962, s. 653-663.
- GAY, C. C.: Problems of immunization in the control of *Escherichia coli* infection. Ann. N. Y. Acad. Sci., 176, 1971, s. 336-349.
- GLANTZ, P. J.: Serotypes of *Escherichia coli* associated with colibacillosis in neonatal animals. Ann. N. Y. Acad. Sci., 176, 1971, s. 67-79.
- GOSSLING, J. — MC KAY, K. A. — BARNUM, D. A.: Colibacillosis of calves in Ontario. I. A serological study of *Escherichia coli* strains. Can. vet. J., 5, 1964, s. 151-159.
- KAECKENBEECK, A. — THOMAS, J.: A propos des sérotypes colibacillaires dans la diarrhée des veaux. Détermination des antigènes somatiques (O). Annls Méd. vét., 104, 1960, s. 232-239.
- MURPHY, T.: *E. coli* serotypes associated with colibacillosis in Irish calves. Ir. vet. J., 27 (11), 1973, s. 197-207.
- NEWMAN, F. S. — MYERS, L. L. — FIREHAMMER, B. D. — CATLIN, J. E.: Prevention of experimentally induced enteric colibacillosis in newborn calves. Infect. Immun., 8 (4), 1973, s. 540-543.
- PODKOPAJEV, V. M. — ŠIŠKOV, V. P.: Diagnostika, lečenijs i profilaktika boleznej novoroždennych teljat. Izd. Kolos, Moskva 1967, 168 s.
- POHL, P. — THOMAS, J.: Antigènes somatiques des colibacilles responsables des septicémies du veau en Belgique de 1967 a 1971. Annls Méd. vét., 116, 1972, s. 661-668.
- RAŠKA, K. — MATĚJOVSKÁ, D. — MATĚJOVSKÁ, V. — POLÁK, L. — KACOVSKÁ, A.: Epizootologie akutních průjmů telat. Veterinářství, 24, 1974, č. 1, s. 20-21.
- REES, T. A.: Studies on *Esch. coli* of animal origin. I. *E. coli* from natural outbreaks of colibacillosis of calves. II. *E. coli* from young lambs. J. comp. Path., 68, 1958, s. 388-398; 399-401.
- SALAJKA, E.: Koliinfekce u telat z hlediska etiologického. [Závěrečná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1966. 75 s.
- SALAJKA, E. — ŠARMANOVÁ, Z. — HORNICHOVÁ, A.: Specifita diagnostických sér pro určování 0-antigenů *Escherichia coli* aglutinací. Vet. Med. (Praha) 20, 1975, č. 10-11, s. 633-644.

- SALAJKA, E. — ULMANN, L. — ŠARMANOVÁ, Z. — HORNICH, M.: Studium kolinfekcí novorozených telat z hlediska prevence. [Závěrečná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1970. 66 s.
- SCHOENAERS, F. — KAECKENBEECK, A.: Septicémie colibacillaire du veau nouveau-né. Antigènes somatiques des colibacilles isolés en Belgique de 1960 a 1966. *Annls. Méd. vét.*, 118, 1974, s. 1-7.
- SMITH, H. W. — HALLS, S.: Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs, and rabbits. *J. Path.*, 93, 1967, s. 499-529.
- SMITH, H. W. — HALLS, S.: The experimental infection of calves with bacteraemia-producing strains of *Escherichia coli*: the influence of colostrum. *J. med. Microbiol.*, 1, 1968, s. 61-78.
- SMITH, H. W. — HALLS, S.: The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls enterotoxin production. *J. gen. Microbiol.*, 52, 1968, s. 319.
- SMITH, H. W. — LINGGOOD, M. A.: The transmissible nature of enterotoxin production in human enteropathogenic strains of *Escherichia coli*. *J. med. Microbiol.*, 4, 1971, s. 301.
- SMITH, H. W. — LINGGOOD, M. A.: Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet enterotoxins and of K antigen possessed by calf and lamb strains. *J. med. Microbiol.*, 5, 1972, s. 243.
- ULBRICH, F.: Serologische Typendifferenzierung und Prüfung toxischer und immunisierenden Eigenschaften von *E. coli*stämmen, die von gesunden und von an Coliruhr erkrankten Jungtieren isoliert wurden. *Zentbl. VetMed.*, 1, 1954, s. 603.
- VALLÉE, A. — RENAULT, L. — LE PRIOL, A.: Infections colibacillaires de veaux: Étude sérologique (groupes 0) de souches d'*Escherichia coli* isolées en France. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 43, 1970, s. 383-389.
- WILLINGER, H. — MATHOIS, H.: Serologische Typisierung von Colisepsisstämmen beim Kalb. *Wien. tierärztl. Mschr.*, 52, 1965, s. 155.
- WRAMBY, G.: Investigations into the antigenic structure of *Bact. coli* isolated from calves. *Acta path. microbiol. scand.*, LXXVI, 1948, s. 159.
- YALCIN, N. — GANE, P. — DELAHAYE, J. — MITTON, A.: Role pathogène d'*Escherichia coli* et de *Welchia* dans la mortalité du veau. Leur sensibilité aux antibiotiques. *Recl. Méd. vét.*, 145, 1969, s. 361-368.

Došlo dne 12. 6. 1975

САЛАЙКА Е., ШАРМАНОВА З., ГОРНИХ М., УЛМАНН Л. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). 0-антигены штаммов *E. coli* из телят, больных поносом в раннем постнатальном периоде. *Vet. Med. (Praha)* 20 (10-11): 645-658, 1975.

Было проведена типизация 0-антигенов бактерий *E. coli*, изолированных на 2356 телят, больных поносом в раннем постнатальном периоде. Такая совокупность обследованных животных подразделялась на две группы. В первую группу входили телята с бактериемией. *E. coli* (бактерии изолированы из печени), всего было 288 телят. Во вторую группу входило 2068 телят, больных поносом без бактериемии. При применении 79 моновалентных сывороток для типизации 0-антигенов *E. coli* у обследуемых телят было установлено несколько 0-групп *E. coli*, которые значительно преобладали над остальными группами. У штаммов *E. coli* в группе телят с бактериемией чаще всего встречался диагноз антигенов 078 (23,6 %), 015 (21,5 %), 0101 (13,5 %) и 08 (4,9 %). В группе телят, страдающих поносом без бактериемии, самая большая частота *E. coli* была с антигенами 0101 (14,8 %), 09 (12,5 %), 08 (6,9 %) 08 + 0141 (5,4 %) и 0117 (5,1 %).

телята; *E. coli* 0-антигены; бактериемия; поносные коли-инфекции

SALAJKA R., ŠARMANOVÁ Z., HORNICH M., ULMANN L. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). 0-Antigens of *E. coli* Strains from Calves Suffering from Diarrhoea in the Early Post-Natal Period. *Vet. Med. (Praha)* 20 (10-11): 645-658, 1975.

Typing was performed in the 0-antigens of *Escherichia coli* bacteria isolated from 2356 calves suffering from diarrhoea in the early post-natal period. This set of examined animals was divided into two groups. One group was represented by bacteraemic calves. It comprised 288 calves in which the *E. coli* bacteria were iso-

lated from liver. In the other group the calves were attacked by diarrhoea without bacteraemia; this latter group consisted of 2068 calves. When 79 monovalent serums were used for the typifying of *E. coli* 0-antigens, several *E. coli* 0-serum groups showing a considerable prevalence over other groups were found in the studied calves. In the *E. coli* strains in the group of calves suffering from bacteraemia the most frequent antigens were the following: 078 (23.6 %), 015 (21.5 %), 0101 (13.5 %), and 08 (4.9 %). In the group of calves suffering from diarrhoea without bacteraemia, the highest frequency was found in *E. coli* with antigens 0101 (14.8 %), 09 (12.5 %), 08 (6.9 %), 08+0141 (5.4 %), and 0117 (5.1 %).

calves; *Escherichia coli*; 0-antigens; bacteraemia; diarrhoeic *E. coli*-infections

SALAJKA E., ŠARMANOVÁ Z., HORNICH M., ULMANN L. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). 0-Antigene von *E.-coli*-Stämmen von mit Durchfall in der frühen postnatalen Periode betroffenen Kälbern. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 645-658, 1975.

Es wurde eine Typisierung der 0-Antigene von *Escherichia coli*, isoliert aus 2356 an Durchfall in der frühen postnatalen Periode leidenden Kälbern, durchgeführt. Diese Gruppe der untersuchten Tiere wurde in zwei Untergruppen eingeteilt. Die erste Untergruppe umfaßte Kälber mit Bakteriämien. Es handelte sich um 288 Kälber, bei denen *E.-coli*-Bakterien aus der Leber isoliert wurden. In der zweiten Untergruppe befanden sich die an Diarrhoe ohne Bakteriämie erkrankten Kälber. Dazu gehörten 2068 Kälber. Bei Benutzung von 79 monovalenten Seren zur Typisierung von *E.-coli*-0-Antigenen wurden bei den untersuchten Kälbern einige *E.-coli*-0-Serumgruppen festgestellt, die ausgeprägt alle übrigen Serumgruppen überragten. Bei den *E.-coli*-Stämmen in der Untergruppe der Kälber mit Bakteriämie war der Befund von Antigenen 078 (23,6 %), 015 (21,5 %), 0101 (13,5 %) und 08 (4,9 %) am häufigsten. In der Untergruppe der an Diarrhoe ohne Bakteriämie leidenden Kälber wiesen die höchste Frequenz die *E. coli* mit den Antigenen 0101 (14,8 %), 09 (12,5 %), 08 (6,9 %), 08+0141 (5,4 %) und 0117 (5,1 %) auf.

Kälber; *Escherichia coli*; 0-Antigene; Bakteriämie; diarrhoeische Coliinfektion

Adresa autorů:

MVDr. E. Salajka, CSc., RNDr. Z. Šarmanová, MVDr. M. Hornich, MVDr. L. Ulmann, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

SPECIFICKÁ PREVENCE A LÉČBA DIARRHOICKÝCH KOLIINFEKČÍ U NOVOROZENÝCH TELAT

E. Salajka, L. Ulmann, Z. Šarmanová, M. Hornich

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

SALAJKA E., ULMANN L., ŠARMANOVÁ Z., HORNICH M. *Specifická prevence a léčba diarrhoických koliinfekcí u novorozených telat.* Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 659-670, 1975.

Vakcína ze šesti v ČSSR nejčastějších sérotypů *E. coli* enteropatogenních pro telata (09:K32; 09:K?[2337]; 09:K?[3935]; 0101:K28; 0101:K30; 08+0141:K?[3381]) byla použita k vakcinaci březích krav a jalovic ve 14 chovech skotu s enzootickým výskytem enterálních koliinfekcí u telat. Z 1573 telat sajících u vakcinovaných matek uhynulo 36 kusů, tj. 2,3 %. Z kontrolních 2037 telat sajících u matek nevakcinovaných uhynulo 334 telata, tj. 16,3 %. Polyvalentní sérum připravené imunizací býků stejnými kmeny *E. coli* bylo použito k perorální léčbě 430 telat s průjmem, z nichž se 395 (91,9 %) uzdravilo a 35 (8,1 %) uhynulo. K vyléčení telete bylo potřeba průměrně čtyř dávek séra po 50 ml. Využitím lokální pasivní imunity ve stěvě lze i v zamořeném prostředí ochránit novorozená telata před onemocněním diarrhoickými koliinfekcemi.

telata; enterální koliinfekce; prevence; léčba; polyvalentní vakcína; polyvalentní sérum

Koliinfekce u telat jsou představovány dvěma formami onemocnění: septikemickou a enterální.

Poměrně řídké se vyskytující septikemická forma se projevuje apatií, zvýšenou teplotou a někdy průjmem. K hynutí telat dochází ve věku pět až deset dnů. Pitevní nález je charakterizován více či méně vyjádřenými známkami septického stavu, tj. krváčeninami na serozách a na srdci, tumorem sleziny a někdy gastroenteritidou. Diagnóza je potvrzována izolací bakterií *Escherichia coli* z parenchymatózních orgánů. Toto onemocnění vyvolávají tzv. invazní typy *E. coli*, které se vyznačují schopností množení v séru telat, která ještě nedostala kolostrum. Tyto typy *E. coli* nejsou enteropatogenní.

Daleko častější enterální forma se objevuje v prvních dnech po narození a vyznačuje se několikadenním vodnatým průjmem, dehydratací organismu a hynutím nebo vyléčením podle stupně onemocnění a podle úspěchu či neúspěchu terapeutických zásahů. Patomorfologický obraz nemá charakteristické znaky. Gastroenteritida se vyskytuje jen u části případů; v řadě případů nejsou na trávicím traktu zjištělné patomorfologické změny. Zpravidla lze zjistit nespecifické dystrofické změny v parenchymatózních orgánech a známky cirkulačních poruch. Bakteriologické vyšet-

ření parenchymatózních orgánů bývá negativní. Původce onemocnění, *Escherichia coli*, který bývá izolován jen ze střeva, se vyznačuje enteropatogenitou, tj. produkcí enterotoxinů a schopností množit se v předních partiích tenkého střeva.

Možnost vyvolat septickou formu koliinfekcí u telat bezkolostrálních je známá více než 50 let (Smith a Little, 1922). Již více než 20 let je známé, že ochranný účinek kolostra proti infekcím je vázán na kolostrální imunoglobuliny (Aschaffenburg aj., 1951).

Přirozený výskyt kolisepsi je zpravidla vázán na agamaglobulinemii u telat, kterým bylo odepřeno kolostrum, nebo na hypogamaglobulinemii, která se vyskytuje z důvodů zatím neznámých u některých telat, přestože přijímala normální kolostrum (Fey a Margadant, 1961, 1962; Gay, 1971).

Výskyt enterálních forem koliinfekcí u telat hlavně v zimě a na jaře, tedy v období zimního, často neplnohodnotného krmení krav, přispěl ke vzniku názoru, že střevní mikroflóra, a tedy i *E. coli*, se v těchto případech uplatňuje jako činitel sekundární. Dřívější negativní výsledky v pokusech o vyvolání enterální formy koliinfekcí u telat krmených kolostrem tento názor do určité míry podporovaly (Smith, 1962). V těchto pokusech však byly zřejmě použity kmeny *E. coli* neprověřené na enteropatogenitu.

Při použití enteropatogenních kmenů *E. coli* byly pokusy o umělé vyvolání enterálních koliinfekcí s typickými příznaky onemocnění úspěšné, a to u telat kojených matkami, u nichž ani v krevním séru ani v kolostru nebyly přítomny protilátky proti K-antigenům použitých patogenických kmenů *E. coli* (Salajka a Gilka, 1968). Přítomnost protilátek proti O-antigenům neovlivnila výsledek pokusu. Imunizací březích krav bylo dosaženo produkce protilátek proti K-antigenům, které byly pak prokazatelné v krvi a hlavně v kolostru. Telata sající u takových matek neonemocněla ani po masivní umělé infekci.

Imunizace krav polyvalentní vakcínou obsahující tři až pět enteropatogenních typů *E. coli* se ukázala jako účinná nejen pro ochranu telat z prvního porodu po vakcinaci, ale i pro telata z porodů dalších (Salajka a Ullmann, 1971). Telata vakcinovaných matek, narozená při prvním, druhém a třetím porodu po vakcinaci, dobře odolala čelenžující infekci enteropatogenními kmeny *E. coli* obsaženými ve vakcíně, zatímco stejně infikovaná kontrolní telata od matek neimunizovaných onemocněla smrtelnými průjmy.

O pozitivním protekčním účinku imunizace březích krav vakcínami proti enterálním koliinfekcím novorozených telat referovali Schoenars a Kaackenbeeck 1963, 1964, 1967 a 1968). Tito autoři (1968) postulovali revakcinaci březích krav při každé březosti a uváděli, že v jejich pokusech po první vakcinaci onemocnělo 18,17 % telat, po první revakcinaci 10,9 % a po druhé revakcinaci jen 5,6 %.

Wilson (1972) uvádí, že kolostrum a mléko imunizovaných krav nemá baktericidní účinek, ale značně inhibuje množení *E. coli*.

Myers aj. (1973) srovnávali protekční účinek kolostra od krav imunizovaných kombinovaně s. c. a intramamárně třemi vakcínami, a to z živých bakterií *E. coli*, z atenuovaných bakterií a toxinem bez bakterií.

Uspokojivý protekční výsledek byl dosažen jen při vakcinaci atenuovanými bakteriemi.

Dobrescu a Huygelen (1973) dosáhli vakcinací 100 březích krav polyvalentní vakcínou „ECOMUN“, která je sestavena z kmenů *E. coli* séro skupin 09, 015, 055, 078, 086, 0115 a 0117, snížení úhynu telat onemocnělých kolibacilózou na 1 % proti 8 % úhynu u kontrolní skupiny. Autoři však nerozlišují septické a enterální formy koliinfekcí u telat.

Dam (1973) uvádí, že úhyn telat v důsledku kolisepsi se v posledních letech v Dánsku podstatně snížil a pohybuje se kolem 5 % u živě narozených mláďat v důsledku preventivní s. c. aplikace komerčně vyráběného specifického polyvalentního koliséra.

Ochrana novorozených telat proti enterálním koliinfekcím není podmíněna přítomností specifických protilátek v krevním oběhu, získaných z kolostra během prvního dne po narození či podaných parenterálně, ale hlavně lokální chráněností střevní sliznice opakovaným přísunem protilátek obsažených v kolostru a mléce imunizovaných matek. Ochrana proti střevním infekcím perorálním přísunem protilátek byla opětovně prokázána na gnotobiotických selatech (Köhler a Bohl, 1966, 1967, 1969, Köhler, 1967, Salajka aj., 1971). Gnotobiotická selata infikovaná enteropatogenními typy *E. coli* bylo možno ochránit před onemocněním či z onemocnění vyléčit opakovanou perorální aplikací specifických antisér, bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost specifických protilátek v jejich krevním oběhu.

Kladné výsledky pokusů s perorálním přísunem protilátek provedených na gnotobiotických selatech a pokusů na telatech v několika chovech s výskytem diarrhoických koliinfekcí (Salajka a Ulmann, 1971) ukázaly na možnost specifické ochrany a léčby při enterálních koliinfekcích novorozených telat prostřednictvím pasivní imunizace a na potřebu rozsáhlejšího ověření těchto zákroků. Tato práce uvádí výsledky terénního ověření účinnosti polyvalentní vakcíny a polyvalentního séra proti enterálním koliinfekcím novorozených telat, připravených z enteropatogenních kmenů *E. coli* izolovaných v řadě tuzemských chovů skotu s enzootickým výskytem průjmů u telat v raném postnatálním období.

MATERIAL A METODA

PŘÍPRAVA POLYVALENTNÍ VAKCÍNY A SÉRA

Kmeny pro přípravu polyvalentní vakcíny byly vybrány na základě frekvence výskytu různých séro skupin *E. coli* podle 0-antigenů z telat s průjmy v ČSSR (Salajka aj., 1975) a na základě testů enteropatogenity. Pořadí nejfrekventovanějších séro skupin *E. coli* v uvedené práci je následující: 0101 (14,8 %), 09 (12,5 %), 08 (6,9 %), 08+0141 (5,4 %), 0117 (5,1 %), 015 (3,0 %), 011 (2,3 %) a 0141 (1,9 %). V testech patogenity, provedených na podvázaných kličkách střevních u telat, bylo zkoušeno 28 typových kmenů z International Escherichia Centre v Kodani, patřících do pěti séro skupin udávaných v zahraniční literatuře za vyvolavatele koliinfekcí u telat, a 84 vlastních kmenů *E. coli* příslušných do 22 séro skupin (tab. I). U kmenů *E. coli* izolovaných z telat s průměrem v ČSSR byla zjištěna produkce enterotoxinů hlavně u příslušníků séro skupin 09, 0101 a 08+0141.

U enteropatogenních kmenů *E. coli* z uvedených tří séro skupin byly vyšetřeny jejich K-antigeny. Přitom bylo zjištěno, že séro skupina s kombinací dvou 0-antigenů 08+0141 je homologní, její K-antigen však nebyl definitivně zařazen. V séro skupi-

nách 09 a 0101 se projevila v K-antigenech pluralita. V séro skupině 09 byly zjištěny tři rozdílné K-antigeny. U části kmenů byl identifikován antigen K32; u části kmenů byly zjištěny dva K-antigeny nové, odlišné od dosud známých K-antigenů. V séro skupině 0101 byly zjištěny antigeny K28 a K30.

I. Souhrn výsledků zkoušek enteropatogenity kmenů *E. coli* z telat na podvázaných kličkách střevních

a) Typové kmeny z International *E. coli* Centre Kodaň

Séro skupina	Počet vyšetřených kmenů	Výsledek		
		pozitivní	negativní	dubiózní
08	14	—	—	14
09	9	—	—	9
015	2	—	—	2
0115	1	—	—	1
0137	2	—	—	2
Celkem	28	—	—	28

b) Kmeny z telat s průměrem (ČSSR)

02	1	—	1	—
04	3	—	3	—
08	7	2	5	—
09	16	12	4	—
011	4	2	1	1
015	4	—	4	—
026	1	—	1	—
041	1	—	1	—
049	1	—	1	—
078	1	—	1	—
0101	17	11	1	5
0108	2	—	2	—
0112	1	—	1	—
0115	1	—	1	—
0117	3	—	3	—
0119	1	—	1	—
0133	1	—	1	—
0141	3	1	2	—
08+0141	10	10	—	—
073+019	1	—	1	—
0112+0119	1	—	—	1
neurč.	4	1	3	—
Celkem	84	39	38	7

II. Průměrné titry specifických aglutininů v krevním séru a kolostru pěti skupin krav imunizovaných podle rozdílného schématu hexavalentní adsorbátovou vakcínou proti enterálním kolinfekcím novorozeneých telat
(V každé skupině je hodnoceno 10 krav)

Kmeny <i>E. coli</i>	Skupina /den imunizace a dávka/ den odběru krve									
	I		II		III		IV		V	
	30. 3.-20 ml 13. 4.-20 ml		30. 3.-20 ml 13. 4.-10 ml		30. 3.-20 ml 3. 5.-20 ml		30. 3.-20 ml 31. 5.-20 ml		30. 3.-20 ml 16. 5.-10 ml 31. 5.-10 ml	
	14. 6.		14. 6.		14. 6.		14. 6.		14. 6.	
	sérum	kolo- strum	sérum	kolo- strum	sérum	kolo- strum	sérum	kolo- strum	sérum	kolo- strum
titr aglutininů proti O-antigenu (-log ₂)										
3259	5,4	5,7	5,8	7,2	6,0	6,7	5,5	6,6	5,2	8,4
3393	6,6	8,6	7,3	9,0	7,1	9,3	7,0	8,9	6,6	9,8
3381	3,6	7,1	5,8	8,2	5,0	8,5	5,3	7,1	4,6	7,6
titr aglutininů proti KO-antigenu (-log ₂)										
3259	3,4	5,9	3,8	6,6	4,8	6,3	5,3	6,4	4,8	7,8
2337	3,8	4,7	3,9	5,5	3,8	4,8	4,5	4,9	4,8	5,6
3935	8,0	4,9	9,3	4,6	6,2	3,5	7,5	5,9	10,0	5,2
3393	5,2	5,4	6,5	5,6	6,2	5,1	6,3	5,9	5,8	6,0
2338/1	3,0	3,7	4,3	5,1	3,8	5,1	4,5	5,1	4,6	5,8
3381	2,8	5,3	2,9	5,6	3,0	5,8	3,5	5,3	3,6	5,9

III. Průměrné titry specifických aglutininů v krevním séru 20 krav v průběhu imunizace třemi dávkami po 20 ml hexavalentní adsorbátové vakcíny proti enterálním kolinfekcím novorozeneých telat

Kmen <i>E. coli</i>	Před vakcinací	Dva týdny po první dávce	Dva týdny po druhé dávce	Čtyři týdny po třetí dávce
titr aglutininů proti O-antigenu (-log ₂)				
3259	4,6	5,6	5,9	6,1
3393	5,8	6,4	6,8	7,0
3381	5,2	5,8	6,3	6,5
titr aglutininů proti KO-antigenu (-log ₂)				
3259	1,1	2,6	3,2	3,6
2337	1,3	2,5	3,5	3,6
3935	3,9	6,1	6,7	7,2
3393	3,0	3,9	4,7	4,8
2338/1	1,0	2,2	2,8	3,7
3381	1,2	2,5	2,8	3,4

Pro přípravu vakcíny bylo použito šest kmenů *E. coli*:

- kmen č. 3259 sbírky VÚVL v Brně sérotypu 09 : K32
- kmen č. 2337/1 sbírky VÚVL v Brně séroskopiny 09 : K?
- kmen č. 3935 sbírky VÚVL v Brně séroskupiny 09 : K?
- kmen č. 3393 sbírky VÚVL v Brně sérotypu 0101 : K28
- kmen č. 2338/1 sbírky VÚVL v Brně sérotypu 0101 : K30
- kmen č. 3381 sbírky VÚVL v Brně séroskupiny 08+0141 : K?

Kultury těchto kmenů jsou udržovány na Dorsetově vaječné půdě. Pro přípravu vakcíny byly jednotlivé kultury namnoženy v aerovaném tekutém mediu (vodný roztok 2,5% enzymatického hydrolyzátu kaseinu, 0,1% kvasničného extraktu a přídavek NaCl do 0,9%) 18hodinovou inkubací při teplotě 37 °C. Jednotlivé kultury byly smíchány a devitalizovány přidávkem 0,5% formalinu. Pak byl ke čtyřem dílům směsného bakterinu přidán jeden díl 5% gelu Al(OH)₃. Imunizační postup, skládající se ze tří s. c. aplikací vakcíny do laloku březích krav a jalovic v dávce 20 ml ve 14denních intervalech, byl vybrán na základě protilátkové odezvy z pokusů uvedených v tab. II a III.

IV. Titr aglutininů v polyvalentním séru proti enterálním koliinfekcím telat

Kmeny <i>E. coli</i>		Agglutiny proti antigenu	
evid. číslo	sérotyp	O	KO
3259	09 : K32	320	160
2337/1	09 : K? (2337)	320	80
3935	09 : K? (3935)	320	640
3393	0101 : K28	320	80
2338	0101 : K30	320	80
3381	08+0141 : K? (3381)	320	80

Polyvalentní sérum pro perorální léčbu enterálních koliinfekcí telat (tab. IV) bylo vyráběno imunizací žírných býků a jalovic bakterinem z kmenů *E. coli* zařazených ve vakcíně. Sérum bylo získáno z krve zachycené při porážce hyperimunizovaných zvířat na jatkách. Sérum bylo konzervováno přidávkem 0,3% betapropiolaktonu s následnou úpravou pH přidávkem 0,5% TRISu.

POKUSNÁ ZVÍŘATA A SESTAVA POKUSŮ

Ochranný účinek vakcinace byl prověřován v letech 1971 až 1973 ve 14 chovech skotu s enzootickým výskytem průjmů u telat v raném postnatálním období srovnáním nemocnosti a hynutí telat od matek vakcinovaných a nevakcinovaných (tab. V). Telata nebyla uměle infikována. Byla po narození napájena mlezivem a mlékem vlastních matek nebo ponechána u nich sát a ustájena v prostředí zamořeném enteropatogenními typy *E. coli*. Ve třech lokalitách byla pokusná skupina březích krav a jalovic imunizována zkoušenou vakcínou a u kontrolní skupiny zvířat bylo aplikováno placebo sestávající ze sterilního kaseinhydrolyzátového media s přidávkem Al(OH)₃. Ve čtyřech lokalitách byla imunizována celá stáda plemenic. Celkové hynutí telat v období po vakcinaci bylo pak srovnáno s hynutím v období před ní. V sedmi chovech byla v průběhu pokusu imunizována jen část březích plemenic a část byla ponechána pro kontrolu bez vakcinace. V těchto chovech byla kromě hynutí sledována i nemocnost telat. Nemocná telata byla vesměs léčena obvodními veterinárními lékaři převážně antibiotiky podle jejich vlastního rozhodnutí.

Léčebný účinek polyvalentního kolisera byl zkoušen u 425 telat s průjmy od nevakcinovaných matek v 10 lokalitách s enzootickým výskytem průjmů u novoro-

V. Výsledek imunizace krav a jalovic hexavalentní kolivakcínou v chovech s enzootickým výskytem průjmů u novorozených telat

Lokalita		Telata od matek										Kontrolní skupina
		vakcinovaných					kontrolních					
chov	okres	naro- zeno ks	one- mocnělo průměm		uhynulo		naro- zeno ks	one- mocnělo průměm		uhynulo		
			ks	%	ks	%		ks	%	ks	%	
JZD K.	Ústí n/O.	8	*	*	0	0,0	8	*	*	4	50,0	placebo
JZD B.	Pardubice	72			1	1,4	68			7	10,3	
ČSSS H.	Znojmo	129			4	3,2	145			18	12,4	
JZD Ch.	Trutnov	195	*	*	3	1,5	171	*	*	41	23,9	stav v době před vakcinací
JZD S. P.	Hodonín	242			2	0,8	154			19	12,3	
JZD M. Ž.	Břeclav	180			3	1,6	361			38	10,5	
JZD M. H.	Ml. Boleslav	121			4	3,3	358			106	29,6	
ČSSS T.	Tachov	155	29	18,7	4	2,7	169	94	61,0	39	23,0	část plemenic bez vakcinace
JZD P.	Benešov	31	1	3,2	0	0,0	14	10	71,2	6	42,0	
JZD Bu.	Pardubice	58	4	6,9	1	1,7	40	13	32,5	4	10,0	
ČSSS D.	Pardubice	129	8	6,2	2	1,5	188	39	20,7	10	5,3	
3 JZD	Chrudim	153	28	18,3	9	5,9	236	125	53,2	35	14,8	
JZD J.	N. Jičín	87	29	33,2	3	3,5	107	72	67,4	5+	4,7	
JZD H. B.	Břeclav	13	2	15,4	0	0,0	18	15	83,3	2+	13,4	
Celkem		1573	101	16,1	36	2,3	2037	368	47,6	334	16,3	

* neevidováno

+ nízký úhyn v důsledku léčby kolisérem

VI. Léčení telat s průjmem perorálně podávaným hexavalentním kolisérem v chovech s enzootickým výskytem onemocnění

Lokalita		Telata					Průměrný počet léčebných dávek á 50 ml
		léčená		uzdravená		uhynulá	
chov	okres	ks	ks	%	ks	%	
JZD V. P.	Břeclav	48	44	91,7	4	8,3	4,1
JZD H. B.	Břeclav	15	13	86,7	2	13,3	3,9
ČSSS K.	Chomutov	10	9	90,0	1	10,0	4,4
ČSSS V.	Břeclav	35	33	94,3	2	5,7	4,1
JZD R.	Břeclav	17	15	88,3	2	11,7	3,3
JZD B.	Pardubice	30	29	96,7	1	3,3	4,1
ČSSS T.	Tachov	79	71	89,9	8	10,1	3,5
ČSSS H.	Znojmo	135	124	91,9	11	8,1	3,6
ČSSS M. H.	Ml. Boleslav	19	18	94,8	1	5,2	4,5
JZD B.	Břeclav	42	39	92,9	3	7,1	2,9
Celkem		430	395	91,9	35	8,1	3,84

zených telat (tab. VI). Sérum bylo aplikováno jen sajícím telatům trpícím těžkým profúzním průjmem. S léčbou bylo započato v průběhu šesti hodin po zjištění onemocnění. Sérum bylo telatům podáváno jen perorálně třikrát denně v dávkách po 50 ml až do vyléčení. Po vymizení průjmu byla podána ještě jedna dávka séra.

VÝSLEDKY

Imunizace březích krav a jalovic zkoušenou hexavalentní kolivakcínou ve 14 chovech s enzootickým výskytem průjmů u novorozených telat se projevila jako účinná jak ve snížení nemocnosti telat na průjmy, tak i ve snížení ztrát úhynem v důsledku průjmů (tab. V).

V sedmi chovech skotu, ve kterých byl evidován výskyt nemocnosti, onemocnělo ve sledované době průjmem 47,6 % telat od nevakcinovaných matek a 16,1 % telat od matek vakcinovaných. Celkové hynutí telat, evidované ve 14 chovech s enzootickým výskytem průjmů, činilo 16,3 % u telat od matek nevakcinovaných a jen 2,3 % u telat od matek vakcinovaných.

Vakcína byla s úspěchem použita ještě v řadě dalších chovů skotu, v nichž však nebylo možné pro srovnání ponechat kontrolní skupiny neimunizovaných plemenic, nebo získat přesné údaje o nemocnosti a hynutí telat v době před vakcinací. Ve třech chovech skotu (JZD K., okr. Uh. Hradiště, JRD O. a JRD D. v okr. Trnava) se po dočasném vymizení průjmů u telat od matek vakcinovaných hexavalentní kolivakcínou objevilo onemocnění znovu. Při vyšetření telat z dotyčných stájí byly zjištěny enteropatogenní kmeny *E. coli* antigenně odlišné od kmenů zařazovaných v hexavalentní kolivakcíně. Ve dvou případech se jednalo o *E. coli* séro skupiny O11 a v jednom případě o kmeny séro skupiny O8. Rozšířením vakcíny hexavalentní o další stájově specifický enteropatogenní kmen *E. coli* došlo v uvedených případech opět k utlumení výskytu průjmů u telat.

Subkutánní aplikace vakcíny krávám do laloku před *manubrium sterni* neměla nepříznivý vliv na jejich zdravotní stav. V místě depozice vakcíny se objevoval přechodný otok podkožní tkáně s indurací bez hnisání, dosahující ojediněle až velikosti pěsti, který se však během jednoho měsíce po vakcinaci zmenšil na indurovaný uzlík velikosti lískového ořechu a později zcela vymizel.

Hexavalentní kolisérum aplikované opakovaně perorálně telatům s průjmem vykazovalo výborný léčebný efekt (tab. VI). Ze 430 léčených telat se uzdravilo 395, tj. 91,9 %. Průměrná doba potřebná k vyléčení byla jeden a půl dne. Sérum se projevilo jako preparát, který nikterak nenarušoval zdravotní stav léčených zvířat. Léčená telata se nápadně rychle zotavovala z onemocnění, takže nezaostávala ve vývoji za telaty, která neonemocněla.

DISKUSE

Vlastní výsledky uvedené v této práci ukazují na reálnou možnost specifické prevence a léčby diarrhoických koliinfekcí novorozených telat, a tedy na možnost eliminace ztrát způsobovaných touto nozologickou jednotkou.

Výskyt a aktuálnost enterálních koliinfekcí u telat se zdá být otázkou diskutabilní. Ve statistikách z ČSSR bývá udáván výskyt koliinfekcí u asi 2 % z celkových 7 až 8 % uhynulých telat. Je však třeba upozornit, že do tohoto údaje jsou zahrnovány jen diagnosticky potvrzené případy kolipsepsí. Diarrhoické formy koliinfekcí nejsou zpravidla diagnostikovány jako koliinfekce, protože se běžně bakteriologicky nevyšetřují střeva uhynulých telat a nedělá se sérologická typizace bakterií *E. coli*. U asi 40 % uhynulých telat jsou za příčinu uhynutí udávány gastroenterální afekce projevující se klinicky průjmy. Obvykle jsou za příčinu těchto onemocnění pokládány poruchy metabolické. Avšak odůvodněně lze předpokládat, že asi u poloviny z nich se jedná o diarrhoickou formu koliinfekcí, jak ukazují výsledky sérotypizace kmenů *E. coli* z telat s průjmy, provedené S a l a j k o u a j. (1975). Kmeny *E. coli* izolované z 2068 telat stížených diarrhoeou bez bakteriémie, pocházejících z více než 300 lokalit v ČSSR, byly v polovině případů zařazeny do sedmi séroskupin, u jejichž zástupců byla prokázána enteropatogenita.

Samotné výsledky imunizace krav polyvalentní kolivakcínou ukazují na existenci enterální formy koliinfekce u telat v ČSSR, jelikož v chovech s enzootickým výskytem průjmů, v nichž byla vakcinace zkoušena, bylo po vakcinaci hynutí u telat sníženo daleko pod celostátní průměr.

Poměrně malý počet zahraničních prací zaměřených na enterální formu koliinfekcí u telat ve srovnání s daleko větším kvantem prací věnovaných formě septické a ve srovnání s velkou pozorností k enterálním koliinfekcím u selat ukazují na možnost existence rozdílných faktorů podmiňujících výskyt tohoto onemocnění u telat v chovech skotu v ČSSR a v jiných zemích. Mezi tyto faktory patří rozdílná rasová příslušnost chovaného skotu, rozdílná velikost stád skotu a rozdílný způsob chovu. Z vlastní zkušenosti je možno uvést, že v ČSSR se enterální formy koliinfekcí vyskytují hlavně u telat červenostrakatého skotu, kdežto např. u telat importovaného černostrakatého nížinného skotu se vyskytují velmi zřídka, a to i v chovech, ve kterých často onemocní telata červenostrakatá. Vnímavost podmíněnou rasovou příslušností uvádí D a m (1964) u kolipsepsí, které se v Dánsku vyskytují u telat červeného dánského skotu více než dvakrát častěji než u telat plemene Jersey.

Využití pasivní lokální imunity ve střevě u mláďat ohrožených či nemocných enterálními koliinfekcemi, zajištěné buď kolostrum a mlékem od matek imunizovaných polyvalentní kolivakcínou, nebo podáváním léčebného séra, představuje nový, zcela fyziologický způsob ochrany mláďat před onemocněním a nový způsob léčby u těch jedinců, u nichž došlo k onemocnění v důsledku nevyužití zákroků preventivních. Tento způsob prevence a terapie enterálních koliinfekcí má nesporné přednosti před použitím jiných prostředků, jako jsou antibiotika a chemoterapeutika. Specifické protilátky v kolostru a v mléce nebo i v perorálně podávaném séru nemají a ani nemohou mít přímý nepříznivý vliv na organismus mláďat a nemají ani nepříznivý vliv nepřímý, jaký mají antibiotika a chemoterapeutika v důsledku narušení střevní eumikrobie.

Na základě výsledků uvedených v této práci byla v Biovětě, n. p., v Ivanovicích na Hané již r. 1973 zahájena výroba polyvalentní vakcíny a polyvalentního séra proti enterálním koliinfekcím novorozených telat, k jejichž výrobě je v současné době používáno šesti kmenů *E. coli*, které

byly použity k přípravě pokusné vakcíny a séra. Zavedením výroby a využitím těchto biopreparátů však není problém enterálních koliinfekcí telat vyřešen beze zbytku, což v současné době není ani možné. Je totiž nutné předpokládat výskyt a rozšíření dalších pro telata enteropatogenních sérotypů *E. coli*, které v těchto výrobcích nemají své zástupce a které bude třeba do těchto výrobků zařadit.

Literatura

- ASCHAFFENBURG, R. — BARLETT, S. — KON, S. K. — ROY, J. H. B. — WALKER, D. M. — BRIGGS, C. — LOVELL, R.: The nutritive value of colostrum for the calf. 4. The effect of small quantities of colostrum whey and immune lactoglobulins. *Br. J. Nutr.*, 5, 1951, s. 171.
- DAM, A.: Infectious disease among calves in Denmark, with particular reference to septicaemia with *Escherichia coli*. *Bull. Off. int. Epizoot.*, 62, 1964, s. 495-508.
- DAM, A.: Immunoprophylaxie dans la colibacillose du veau principalement par la sérothérapie. *Annls Rech. vét.*, 4, 1973, s. 181-189.
- DOBRESCU, L. — HUYGELEN, C.: Immunoprophylaxie de la septicémie colibacillaire du veau par la vaccination de la vache gestante. *Recl Méd. vét.*, 149, 1973, s. 653-666.
- FEY, H. — MARGADANT, A.: Hypogammaglobulinämie bei der Colisepsis des Kalbes. *Pathologia Microbiol.*, 24, 1961, s. 970-976.
- FEY, H. — MARGADANT, A.: Zur Pathogenese der Kälber-colisepsis. IV. Agamaglobulinaemie als disponierender Faktor. V. Versuche zur künstlichen Infektionen neugeborener Kälber mit dem Colityp 78:80B. *Zentbl. VetMed.*, 9, 1962, s. 653-663; 767-778.
- GAY, C. C.: Problems of immunization in the control of *Escherichia coli* infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 176, 1971, s. 336-349.
- KAECKENBEECK, A. — SCHOENAERS, F. — EL NAGEH, M.: Prophylaxie de la colibacillose du veau par vaccination de la mère. *Annls Méd. vét.*, 111, 1967, s. 3-15.
- KOHLER, E. M.: Studies of *Escherichia coli* in gnotobiotic pigs. V. Evaluation of the effect of oral and parenteral administration of the immune serum. *Can. J. comp. Med.*, 31, 1967, s. 283-296.
- KOHLER, E. M. — BOHL, E. H.: Studies of *Escherichia coli* in gnotobiotic pigs. *Can. J. comp. Med.*, 30, 1966, s. 169-174; 199-203; 233-237; 31, 1967, s. 277-282; 283-289; 33, 1969, s. 173.
- MYERS, L. L. — NEWMAN, F. S. — WILSON, R. A. — CATLIN, J. E.: Passive immunization of calves against experimentally induced enteric colibacillosis by vaccination of dams. *Am. J. vet. Res.*, 34, 1973, s. 29-33.
- SALAJKA, E. — GILKA, F.: Studium patogenezy escherichióz (koliinfekcí) u telat v raném postnatálním období. [Závěrečná zpráva výzk. úkolu.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1968. 75 s.
- SALAJKA, E. — ULMANN, L. — HORNICH, M. — ŠARMANOVÁ, Z.: The pathogenesis of enteric *E. coli* infections in piglets. *Acta vet.*, Brno, 40, 1971, č. 2, s. 65-68.
- SALAJKA, E. — ŠARMANOVÁ Z. — HORNICH, M. — ULMANN, L.: 0-antigeny kmenů *E. coli* z telat stížených průjemem v raném postnatálním období. *Vet. Med. (Praha)*, 20, 1975, č. 10, s. 645-658.
- SALAJKA, E. — ULMANN, L.: Prospects of specific prevention and treatment of diarrhoeic *E. coli* infections in calves in the early postnatal period. *Acta vet.*, Brno, 40, 1971, č. 2, s. 83-86.
- SCHOENAERS, F. — KAECKENBEECK, A.: Etudes sur la colibacillose du veau. *Annls Méd. vét.*, 102, 1958, s. 211-221; 107, 1963, s. 529-543; 108, 1964, s. 3-11; 112, 1968, s. 649-657.
- SMITH, H. W.: Observations on the aetiology of neonatal diarrhoea (scours) in calves. *J. Path.*, 84, 1962, s. 147-168.

SMITH, H. W. — LITTLE, R. B.: The significance of colostrum to the newborn calf. J. exp. Med., 36, 1922, s. 181-198.

WILSON, M. R.: The influence of preparturient intramammary vaccination on bovine mammary secretions. Antibody activity and protective value against *Escherichia coli* enteric infections. Immunology, 23, 1972, s. 947-955.

Došlo dne 12. 6. 1975

САЛАЙКА Е., УЛМАНН Л., ШАРМАНОВА З., ГОРНИХ М. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Специфическая профилактика и лечение поносных коли-инфекций у новорожденных телят. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11): 659-670, 1975.

Бакцина из шести в ЧССР наиболее частых серотипов *E. coli*, энтеропатогенных для телят [09:K32; 09:K?(2337); 09:K?(3935); 0101:K28; 0101:K30; 03+0141:K?(3381)]; применялась для вакцинации стельных коров и телок в 14 разведениях крупного рогатого скота с энзоотическим появлением энтеральных коли-инфекций у телят. Из 1573 телят, сосущих вакцинированных матерей, погибло 36 голов, т.е. 2,3%. Из контрольных 2037 телят, сосущих невакцинированных матерей, погибло 334 теленка, т.е. 16,3%. Поливалентная сыворотка, подготовленная иммунизацией быков одинаковыми штаммами *E. coli* применялась для перорального лечения 430 телят с поносом, из которых 395 (91,9%) выцелилось и 35 (8,1%) погибло. Для излечения теленка необходимо в среднем четырех доз сыворотки по 50 мл. Путем использования пассивного иммунитета в кишке можно также в зараженной среде уберечь новорожденных телят от поносной коли-инфекции.

телята; энтеральная коли-инфекция; профилактика; лечение; поливалентная вакцина; поливалентная сыворотка

SALAJKA E., ULMANN L., ŠARMANOVÁ Z., HORNICH M. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). Specific Prevention and Treatment of Diarrhoeic *Escherichia coli*-Infections in New-Born Calves. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11): 659-670, 1975.

Vaccine from the six *E. coli* serotypes most frequently occurring in Czechoslovakia and showing enteropathogenicity for calves [09:K32; 09:K?(2337); 09:K?(3935); 0101:K28; 0101:K30; 08+0141:K?(3381)] was used for the vaccination of pregnant cows and heifers in 14 cattle herds with an enzootic occurrence of enteral *E. coli*-infections in calves. Thirty-six of 1573 calves sucking milk from vaccinated mothers died (2,3%). As to the control group of 2037 calves sucking milk from non-vaccinated mothers, the mortality reached 334 animals, i. e. 16,3%. The polyvalent serum prepared by the immunization of bulls with the same strains of *E. coli* was used for the peroral treatment of 430 calves suffering from diarrhoea. 395 (91,9%) of these calves recovered and 35 (8,1%) died. The average serum requirement for the recovering of a calf was four doses with 50 ml. each. Even in a contaminated environment, new-born calves can be saved from diarrhoeic *E. coli*-infections if local passive immunity in the intestine is used.

calves; enteral *E. coli*-infections; prevention; treatment; polyvalent vaccine; polyvalent serum

SALAJKA E., ULMANN L., ŠARMANOVÁ Z., HORNICH M. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). Spezifische Prävenz und Therapie von diarrhoeischen Coliinfektionen bei neugeborenen Kälbern. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11): 659-670, 1975.

Die aus sechs in der ČSSR häufigsten für Kälber enteropathogenen *E.-coli*-Serotypen (09:K32; 09:K? [2337]; 09:K? [3935]; 0101:K28; 0101:K30; 08+0141:K? [3381]) hergestellte Vakzine wurde zur Vakzinierung von trächtigen Kühen und Färsen in 14 Rinderzuchten mit enzootischem Auftreten enteraler Coliinfektionen bei Kälbern benutzt. Von 1573 bei den vakzinieren Mütterkühen saugenden Kälbern verendeten 36 Stück, d. s. 2,3%. Von den 2037 Kontrollkälbern, die bei den nichtvakzinieren Mütterkühen saugten, verendeten 334 Stück, d. s. 16,3%. Das durch Immunisierung von

Bullen mit gleichen *E.-coli*-Stämmen hergestellte polyvalente Serum wurde benutzt zur peroralen Therapie von 430 Kälbern mit Durchfällen, von denen 395 (91,9 %) gesunden und 35 (8,1 %) verendeten. Zur Heilung je eines Kalbes wurden durchschnittlich vier Serumdosen zu je 50 ml benötigt. Durch Ausnutzung der lokalen passiven Immunität im Darm kann man auch in einem verseuchten Milieu Kälber vor Erkrankungen an diarrhoeischen Coliinfektionen schützen.

Kälber; enterale Coliinfektionen; Prävenz; Heilverfahren; polyvalente Vakzine; polyvalentes Serum

Adresa autorů:

MVDr. E. Salajka, CSc., MVDr. L. Ulmann, CSc., RNDr. Z. Šarmanová,
MVDr. M. Hornich, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32
Brno

L. Valíček, B. Šmíd

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

VALÍČEK L., ŠMÍD B. *Morfogeneze herpesvirů skotu*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 671-677, 1975.

Srovnávacím elektronově mikroskopickým studiem viru infekční bovinní rhinotracheitidy (IBR) a bovinní herpetické mamilitidy (BHM) nebyly zjištěny rozdíly v morfogenezi těchto virů v buněčných kulturách. Nukleokapsidy viru IBR a BHM se tvořily v jádře buněk a získávaly obal buď při přechodu přes vnitřní lamelu jaderné membrány, nebo pučením do jaderných vakuol, nebo vtlačováním do cytoplazmatických kanálků. Obalování pučením z plazmatické membrány nebylo zjištěno. Některé cytoplazmatické a extracelulární viriony měly mezi obalem a kapsidou elektronově tmavý materiál nejasného původu a významu.

virus infekční bovinní rhinotracheitidy (IBR); virus bovinní herpetické mamilitidy (BHM); elektronová mikroskopie; ultratenké řezy; buněčné kultury; orgánová kultura

Skot je jedním z mála živočišných druhů, u něhož herpetické viry způsobují větší počet onemocnění. V současné době je známo onemocnění komplexu infekční bovinní rhinotracheitidy a infekční pustulární vulvovaginitidy (IBR-IPV), bovinní herpetická mamilitida (BHM), maligní katarální horečka (hlavnička), herpetická keratokonjunktivitida („Movar“ kmen) a Aujeszkyho choroba. Nedávno však byly izolovány ze skotu další herpetické viry (Mohanty aj., 1971; Kaminjolo aj., 1972; Maaten a Boothe, 1972; Rweyemamu a Loretu, 1973; Parks a Kendrick, 1973), avšak o jejich patogenezi a dalších biologických vlastnostech známe velmi málo.

Z herpetických virů skotu je nejobsáhlejší literatura zabývající se morfogenezí viru IBR. V posledních letech studovali některé otázky morfogeneze viru IBR Jasty aj. (1971, 1972), Zee a Talens (1971, 1972), Silva aj. (1973), Chia a Savan (1974). Poměrně málo prací se však zabývá morfogenezí ostatních herpetických virů skotu (Liebermann aj., 1967; Schulze aj., 1967; Martin aj., 1969; Plowright aj., 1965; Šmíd aj., 1971).

Cílem této práce bylo poznat a srovnat morfogenezi dvou herpesvirů skotu, viru IBR a BHM a výsledky konfrontovat se současnými znalostmi o morfogenezi herpesvirů (Roizman a Spear, 1973).

MATERIÁL A METODY

BUŇKY A KULTIVAČNÍ MÉDIA

Pro studium viru infekční bovinní rhinotracheitidy (IBR) byla použita permanentní buněčná linie telecích ledvinových buněk MDBK, buněčná kultura primárních telecích ledvinových buněk (PTL) a orgánová kultura telecí průdušnice (OK). Buňky linie MDBK a PTL buňky byly nasazovány do Eaglova minimálního esenciálního média (MEM) s přidavkem 10 až 20 % telecího séra (TS); jako udržovací médium bylo použito MEM se 2 % TS. Tracheální prstence pro OK byly získány z telecích fétů ve stáří osmi měsíců. Byly nasazovány do Parkerova média 199 s 10 % TS a po infekci udržovány ve stejném médiu bez séra při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂.

Pro studium viru bovinní herpetické mamilitidy (BHM) byly použity stejné buněčné kultury a média jako pro virus IBR; nebyla použita OK.

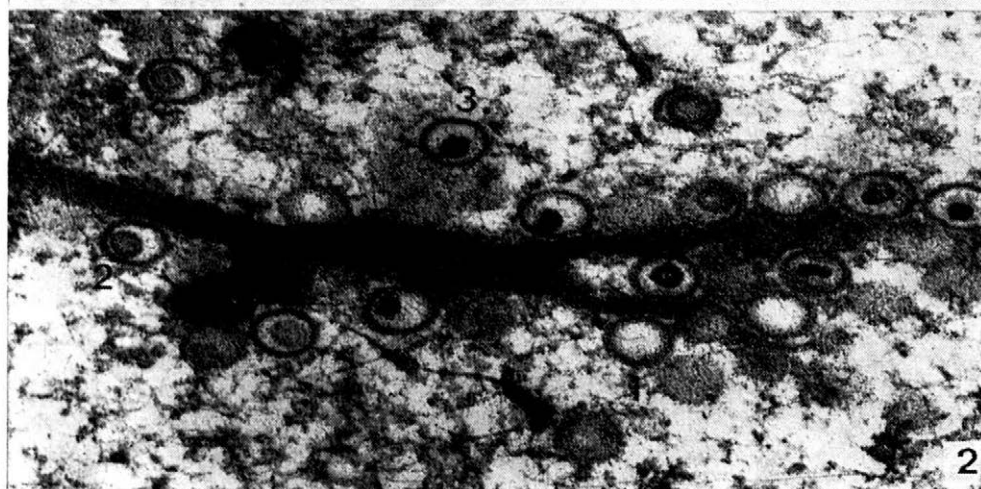
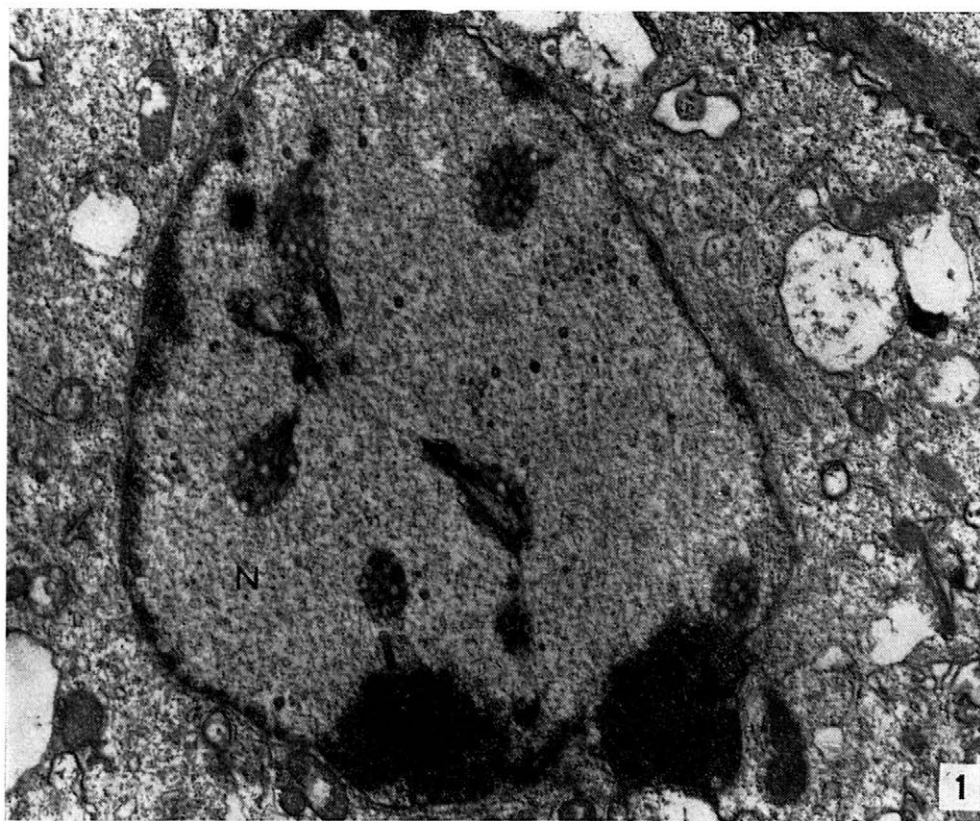
VIRY

K infekci byly použity dva kmeny viru IBR. Kmen LA * (Los Angeles) a kmen R6 *. Kmen LA byl 37krát pasážován na PTL buňkách, kmen R6 byl pasážován osmkrát na PTL buňkách a šestkrát na MDBK buňkách. Titr kmene LA byl 10^{4.5} TKID₅₀ ml⁻¹ a kmene R6 10⁴ TKID₅₀ ml⁻¹. K infekci buněčných kultur virem BHM byl použit kmen TV * v 16. pasáži na PTL buňkách; titr viru byl 10^{4.8} TKID₅₀ ml⁻¹. Při infekci buněčných kultur byl aplikován 1 ml virové suspenze na jednu 300ml Rouxovu láhev; OK byly infikovány 0,2 ml virové suspenze na jeden tracheální prstenec v Petriho misce o průměru 6 cm. Adsorpce probíhala vždy 30 minut při pokojové teplotě.

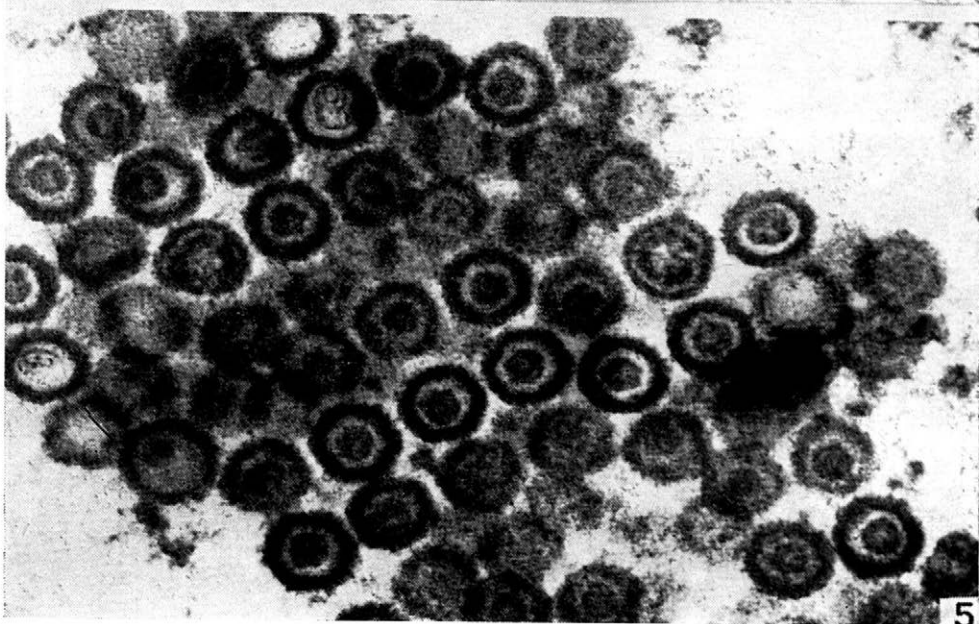
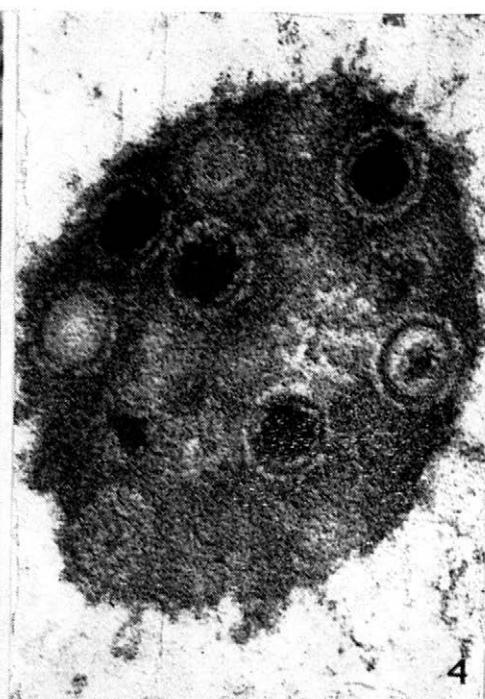
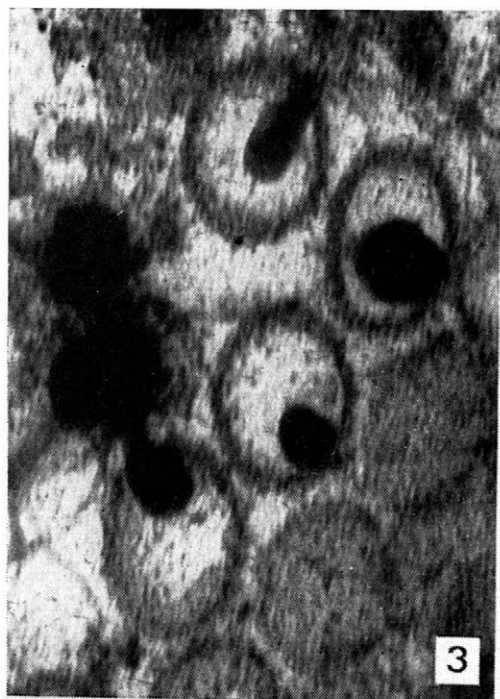
ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

Infikované buněčné kultury byly za 12, 24 a 48 hodin po infekci fixovány jednu hodinu 1% glutaraldehydem v Sörensenově fosfátovém pufru (pH 7,2). Po desetinásobném promytí ve stejném pufru byly seškrabány ze skla, zcentrifugovány a postfixovány 1% OsO₄ ve fosfátovém pufru (pH 7,4) jednu hodinu. Tracheální prstenec OK byly za tři, čtyři a pět dnů po infekci virem IBR fixovány ve 4% formaldehydu v Sörensenově fosfátovém pufru 24 až 72 hodiny při teplotě 4 °C. Po promytí stejným pufrům byly postfixovány jednu hodinu v 1% OsO₄. Všechny vzorky byly odvodňovány v acetonu a zality do Vestopalu W a některé do Durcupanu ACM. Řezy byly zhotoveny na ultramikrotomu Tesla BS 490, barveny 2% vodným roztokem uranylacetátu a roztokem citrátu olova a prohlíženy elektronovým mikroskopem Tesla BS 513.

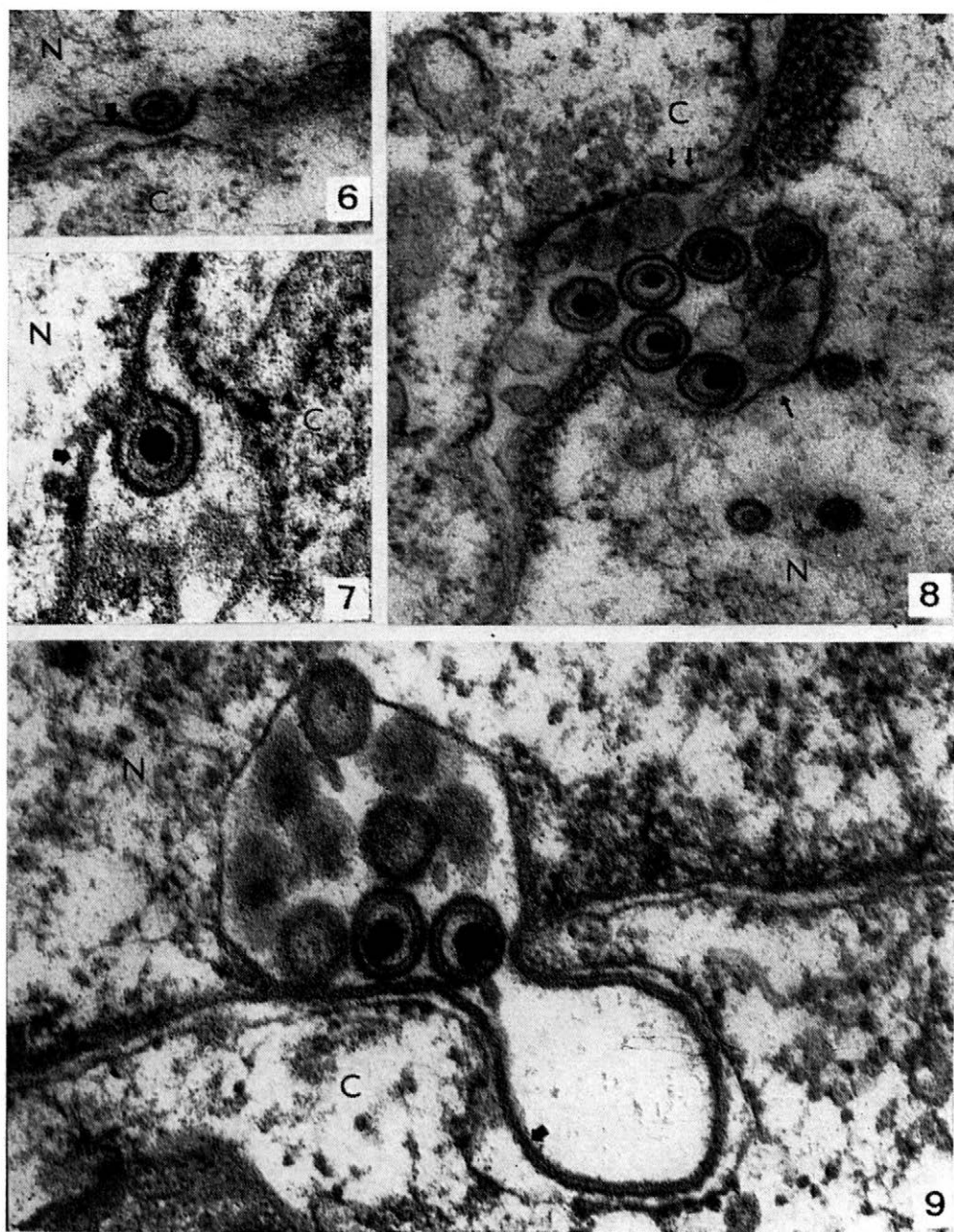
* Kmeny virů byly získány ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů, VÚVL Brno.



1. Nukleokapsidy viru IBR v buněčném jádře (N). $\times 15\,000$
 2. Různé formy nukleokapsid viru IBR v buněčném jádře: 1 — kapsida bez dřeně;
 2 — kapsida se světlou dření; 3 — kapsida s tmavou dření. $\times 63\,000$

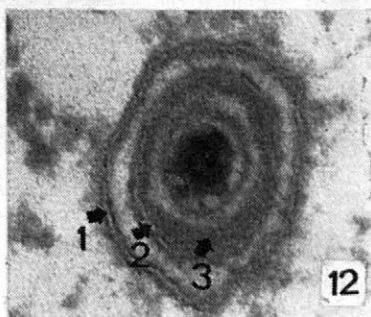
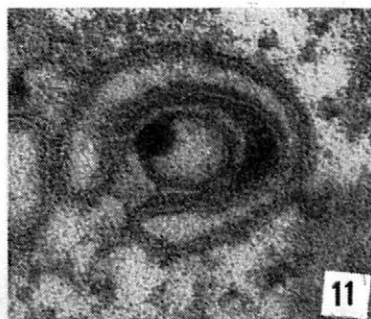
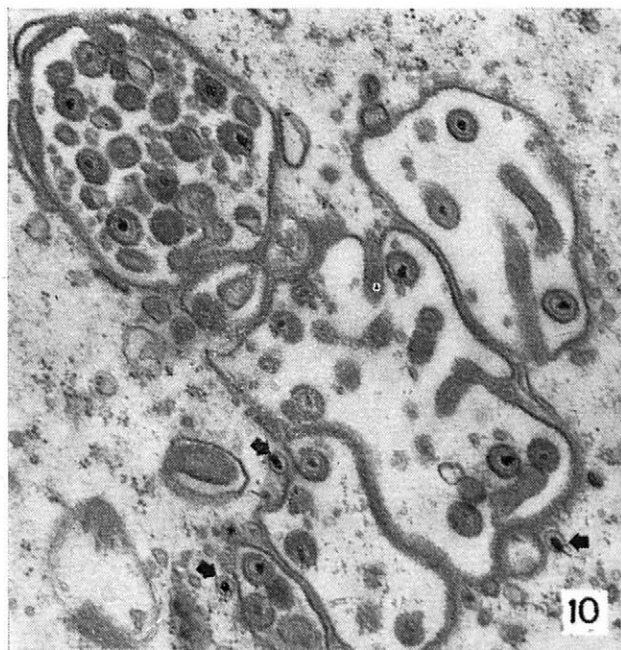


3. Nukleokapsidy viru IBR jsou spojeny s fibrilárním a granulárním materiálem v buněčném jádře. $\times 186\,000$
4. Formující se nukleokapsidy viru IBR uvnitř virové matrix. $\times 97\,000$
5. Krystalické uspořádání nukleokapsid viru BHM v buněčném jádře. $\times 97\,000$



6., 7. a 8. Počáteční, pokročilé a konečné stadium obalování nukleokapsid viru BHM při přechodu přes vnitřní lamelu jaderné membrány (N-nukleus; C-cytoplazma; šipka - vnitřní lamela jaderné membrány; dvě šipky - vnější lamela). X 65 000; X 97 000; X 59 000

9. Viriony IBR v jaderné vakuole, která vznikla reduplikací a proliferací vnitřní lamely jaderné membrány (šipka). X 95 000



10. Viriony IBR v cytoplazmatických kanálcích a nukleokapsidy (šipky) volně v cytoplazmě. $\times 42\,000$

11. Obalování nukleokapsidy IBR vtláčováním do cytoplazmatického kanálku. $\times 106\,000$

12. Virion IBR v cytoplazmatickém kanálku (1 - stěna kanálku; 2 - obal virionu; 3 - tmavý materiál). $\times 135\,000$

13. Viriony IBR na buněčném povrchu. $\times 30\,000$

14. Extracelulární virion IBR (1 - obal; 2 - kapsida; 3 - dřeň). $\times 180\,000$

VÝSLEDKY

Infekce virem IBR a BHM vyvolává v infikovaných buňkách podobné změny. V časných stádiích po infekci dochází v jádře k marginaci chromatinu na periferii, takže střed jádra je elektronově světlý, jádérko je často desagregováno, nebo vytlačeno na periferii. Vznikají buněčná syncytia, která jsou mnohem početnější po infekci virem BHM. V centru jádra se postupně hromadí různé množství tmavého granulárního a fibrilárního materiálu – virová matrix, z níž se tvoří virové nukleokapsidy. Nukleokapsidy se nacházejí v jádře buď ojedinelé, nebo ve shlucích (obr. 1–4), nebo v pravidelném krystalickém uspořádání (obr. 5). Průměr nukleokapsid viru IBR a BHM je kolem 100 nm a dřeň uvnitř kapsidy má různou denzitu, lokalizaci a tvar (obr. 2). Zpočátku infekce převládají nukleokapsidy se světlou dření, později se formují kapsidy s tmavou dření. Některé nukleokapsidy získávají v jádře obal, k čemuž dochází dvěma způsoby. První způsob obalování je při přechodu nukleokapsidy přes vnitřní lamelu jaderné membrány (obr. 6, 7 a 8). Druhý způsob je spojen s reduplikací vnitřní lamely jaderné membrány, která proliferuje do jádra a vytváří uvnitř jádra vakuoly. Do vakuol se mohou vtlačovat nukleokapsidy a vakuolární membrána vytváří přitom obal virionu (obr. 9). Z jádra se viriony dostávají do cytoplazmatických kanálků, kterými jsou transportovány ven z buňky.

V cytoplazmě buněk infikovaných virem IBR a BHM nacházíme jednak nukleokapsidy s obalem (viriony) uvnitř kanálků, jednak neobalené nukleokapsidy volně v cytoplazmě (obr. 10). Nukleokapsidy přecházejí do cytoplazmy z jádra, a to pravděpodobně po porušení jaderné membrány v pokročilejších stádiích infekce. Část nukleokapsid je v cytoplazmě desintegrována, některé se však vtlačují do cytoplazmatických kanálků a membrána vytváří obal virionu (obr. 11 a 12). Po obalení, které je třetím zjištěným způsobem obalování nukleokapsid viru IBR a BHM, jsou viriony transportovány cytoplazmatickými kanálky extracelulárně. Některé cytoplazmatické a extracelulární viriony IBR a BHM (obr. 13 a 14) mají mezi kapsidou a vnějším obalem různé množství tmavého materiálu, takže jsou pleomorfní a jejich velikost značně kolísá.

DISKUSE

Adsorpci a penetraci virionů IBR do buněk sledovali Zee a Talsens (1971) a u jiných herpesvirů Morgan aj. (1968); Dales a Silverberg (1969); Miyamoto a Morgan (1971); Smith a deHarven (1974) aj. V naší práci jsme způsoby vstupu virionů do buněk nesledovali, ale u herpesvirů se všeobecně předpokládá, že některé partikule vstupují do buňky po splnutí virového obalu s plazmatickou membránou (Morgan aj., 1968), jiné procesem podobným fagocytóze (Dales a Silverberg, 1969; obr. 15, stadium 1–4). Není však zcela jasné, který z těchto způsobů vstupu virionů vede k infekci buňky (Roizman a Spear, 1973).

Po vstupu do buňky je odstraněn vnější proteinový obal (kapsida) a uvolněný DNK-proteinový komplex vstupuje do jádra (Roizman a Spear, 1973). Morfologicky se však u viru IBR a BHM nepodařilo

přechod do jádra detekovat, stejně jako u ostatních herpesvirů, a jeho mechanismy jsou všeobecně nejasné (Smith a deHarven, 1974). Formace nových nukleokapsid viru IBR a BHM probíhá v jádře buňky (obr. 1–5), kde se nukleokapsidy nacházejí v různém množství a uspořádání, což je v soulase s dřívějšími nálezy (Jasty aj., 1972; Silva aj., 1973; Chia a Savan, 1974; aj.).



15. Schéma jednotlivých stadií multiplikačního cyklu herpesvirů

Dalším stupněm při maturaci virů IBR a BHM, stejně jako u jiných herpesvirů, je obalování nukleokapsid. Neěkteré nukleokapsidy jsou obalovány v jádře, jiné až v cytoplasmě buňky. V jádře získávají obal při přechodu přes vnitřní lamelu jaderné membrány (obr. 6–8), nebo vtlačováním do jaderných vakuol (obr. 9); v cytoplasmě jsou nukleokapsidy obalovány při vtlačování do cytoplazmatických kanálků (obr. 11). Zjištěné způsoby obalování viru IBR a BHM se tak neliší od způsobů popsaných dříve u viru IBR (Jasty aj., 1971; Zee a Talens, 1972;

Chia a Savan, 1974) a od obalování většiny herpesvirů (obr. 15, stadium 11, 18, 24). Nejistili jsme však obalování pučením z plazmatické membrány buňky, ani formaci obalu v jádře „de novo“, popsané u některých jiných herpesvirů (Epstein aj., 1962; Heine aj., 1971). Otázkou při obalování herpesvirů zůstává, zda virus získává obal ze segmentů modifikovaných preexistujících buněčných membrán, nebo pouze z membrán syntetizovaných po infekci „de novo“ (Roizman a Spear, 1973).

Viriony IBR a BHM jsme v cytoplazmě nacházeli uvnitř kanálků, takže se v souhlase s názory Schwartz a Roizmana (1969) domníváme, že transport virionů se uskutečňuje kanálky modifikovaného endoplazmatického retikula (obr. 15, stadium 15–17, 19–22, 24–26). Existuje však druhý názor, že vakuoly, ve kterých se nacházejí viriony, vznikly z vnější jaderné membrány (obr. 15, stadium 12–14), nebo „odštěpením“ z cytoplazmatických tubulů (Darlington a Moss, 1969).

Nezodpovězenou otázkou v morfogenezi viru IBR a BHM zůstává také původ a složení tmavého materiálu mezi kapsidou a obalem některých virionů (obr. 12); tato otázka je předmětem našeho dalšího studia.

Literatura

- DALES, S. — SILVERBERG, H.: Viroplex of herpes simplex virus by HeLa cells. *Virology*, 37, 1969, s. 475–480.
- DARLINGTON, R. W. — MOSS, L. H.: The envelope of herpesvirus. *Prog. med. Virol.*, 11, 1969, s. 16–45.
- EPSTEIN, M. A. — HUMMELER, K. — BERKALOFF, A.: The entry and distribution of herpes virus and colloidal gold in HeLa cells after contact in suspension. *J. exp. Med.*, 119, 1964, s. 291–302.
- HEINE, V. — ABLASHI, D. V. — ARMSTRONG, G. R.: Morphological studies on *Herpesvirus saimiri* in subhuman and human cell cultures. *Cancer Res.*, 31, 1971, s. 1019–1029.
- CHIA, W. K. — SAVAN, M.: Electron microscopic observations on infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine fetal tracheal organ cultures. *Arch. ges. Virusforsch.*, 45, 1974, s. 185–198.
- JASTY, V. — CHANG, P. W.: Envelope of infectious bovine rhinotracheitis viral particles in bovine kidney cell cultures: An electron microscopic study. *Am. J. vet. Res.*, 32, 1971, s. 1945–1953.
- JASTY, V. — CHANG, P. W. — GOERTEMILLER, C. C. — YATES, V. J.: Infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine kidney cells. II. Viral development and ultrastructural alterations in cultured cells. *Expl. molec. Path.*, 16, 1972, s. 124–137.
- KAMINJOLO, J. S. — MUGERA, G. M. — ROSTED, A. F.: Isolation of a herpes-type virus from some tumours of bovine origin. *Zentbl. VetMed.*, B, 19, 1972, s. 626–632.
- LIEBERMANN, H. — SCHULZE, P. — KOKLES, R. — HANTSCHHELL, H.: Isolierung und Identifizierung eines weiteren neuartigen bovinen Herpesvirus. *Arch. exp. VetMed.*, 21, 1967, s. 761–776.
- MAATEN Van Der, M. J. — BOOTHE, A. D.: Isolation of a herpeslike virus from lymphosarcomatous cattle. *Arch. ges. Virusforsch.*, 37, 1972, s. 85–96.
- MARTIN, W. B. — JAMES, Z. H. — LAUDER, I. M. — MURRAY, M. — PIRIE, H. M.: Pathogenesis of bovine mammillitis virus infection in cattle. *Am. J. vet. Res.*, 30, 1969, s. 2151–2166.
- MIYAMOTO, K. — MORGAN, C.: Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. XI. Entry and uncoating of *herpes simplex* virus. *J. Virol.*, 8, 1971, s. 910–918.

- MOHANTY, S. B. — HAMMOND, R. C. — LILLIE, M. G.: A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. Arch. ges. Virusforsch., 34, 1971, s. 394-395.
- MORGAN, C. — ROSE, H. M. — MEDNIS, B.: Electron microscopy of *herpes simplex* virus. I. Entry. J. Virol., 2, 1968, s. 507-516.
- PARKS, J. B. — KENDRICK, J. W.: The isolation and partial characterization of a herpesvirus from a case of bovine metritis. Arch. ges. Virusforsch., 41, 1973, s. 211-215.
- PLOWRIGHT, W. — MACADAM, R. F. — ARMSTRONG, J. A.: Growth and characterization of the virus of bovine malignant catarrhal fever in East Africa. J. gen. Microbiol., 39, 1965, s. 253-266.
- ROIZMAN, B. — SPEAR, P. G.: Herpesviruses. In: Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages: An atlas. New York and London, Academic Press 1973, 83 s.
- RWEYEMAMU, M. M. — LORETU, K.: Isolation of „non-syncytia forming“ herpes viruses from cattle in Tanzania. J. comp. Path., 83, 1973, s. 377-386.
- SCHULZE, P. — LIEBERMANN, H. — HANTSCH, H. — BARTHA, A. — JUHÁSZ, M.: Licht- und elektronmikroskopische Untersuchungen an einem neuartigen bovinen Herpesvirus. Arch. exp. VetMed., 21, 1967, s. 747-759.
- SCHWARTZ, J. — ROIZMAN, B.: Concerning the egress of *herpes simplex* virus from infected cells: electron and light microscope observations. Virology, 38, 1969, s. 42-48.
- SILVA, R. F. — AMBORSKI, R. L. — WHITE, M. R. — AMBORSKI, G. F.: An electron microscopic study of a single-cycle infection of Madin-Darby bovine kidney cells by infectious bovine rhinotracheitis virus. J. comp. Path., 83, 1973, s. 161-172.
- SMITH, J. D. — HARVEN, E. de.: *Herpes simplex virus* and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. II. An ultrastructural study of viral penetration. J. Virol., 14, 1974, s. 945-956.
- ŠMÍD, B. — VALÍČEK, L. — PLEVA, V.: Bovine *herpes mammillitis* (BHM) virus: Electron microscopy of the virus in tissue culture of primary bovine kidney cells. Zentbl. VetMed., B, 18, 1971, s. 1-8.
- ZEE, Y. C. — TALENS, L.: Entry of infectious bovine rhinotracheitis virus into cells. J. gen. Virol., 11, 1971, s. 59-63.
- ZEE, Y. C. — TALENS, L.: Electron microscopic studies on the development of infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine kidney cells. J. gen. Virol., 17, 1972, s. 333-336.

Došlo dne 12. 6. 1975

ВАЛИЧЕК Л., ШМИД Б. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Морфогенез герпесвирусов крупного рогатого скота. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11): 671-677, 1975.

Путем сравнительного электронно-микроскопического изучения вируса инфекционного бычьего ринотрахеита (IBR) и бычьего герпетического мамилита (BHM) не было установлено различий в морфогенезе этих вирусов в клеточных культурах. Нуклеокапсиды вируса IBR и BHM образовывались в ядре клеток и получали оболочку при переходе через внутреннюю пластинку ядерной мембраны, или набуханием в ядерные вакуоли, или вдавливанием в цитоплазматические каналы. Покрытие оболочкой путем набухания из плазматической мембраны не было установлено. Некоторые цитоплазматические и экстрацеллюлярные вирионы имели между оболочкой и капсидом электронно темный материал неясного происхождения и значения.

вирус инфекционного бычьего ринотрахеита; вирус бычьего герпетического мамилита; электронная микроскопия; ультратонкие срезы; клеточные культуры; органная культура

VALÍČEK L., ŠMÍD B. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). Morphogenesis of Herpesviruses in Cattle. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11): 671-677, 1975. The viruses of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and bovine herpes mammillitis (BHM) were subjected to comparative electronmicroscopic study. The study did not reveal any changes in the morphogenesis of these viruses in cell cultures. Nucleocapsids of the IBR and BHM viruses were formed in the nuclei of cells and got their coating either during transition through the internal lamella of the nuclear

membrane, or by budding into nuclear vacuoles, or by budding into cytoplasmatic canals. No coating by budding from plasmatic membrane was observed. Some cytoplasmatic and extracellular virions had, between the envelope and the capsid, a material of obscure origin and importance, dark under the electronmicroscope.

infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus; bovine herpes mammillitis (BHM) virus; electron microscopy; ultra-thin sections; cellular cultures; organ culture

VALÍČEK L., ŠMÍD B. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Morphogenese der Herpesviren beim Rind*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 671-677, 1975.

In vergleichenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen über das Virus der infektiösen Rhinotracheitis (IBR) und bovinen Herpes-Mammilitis (BHM) wurden keine Unterschiede in der Morphogenese dieser Viren in Zellkulturen festgestellt. Die IBR- und BHM-Virus-Nukleokapsiden bildeten sich im Zellkern und gewannen eine Hülle entweder beim Übergang über die innere Lamelle der Zellmembrane oder durch Sprießen in die Kernvakuolen oder durch Eindringen in die Zytoplasmakanälchen. Die Umhüllung durch Sprießen aus der Plasmamembrane wurde nicht festgestellt. Einige Zytoplasma- und Extrazellulärvirionen wiesen zwischen der Hülle und der Kapside elektronisch dunkles Material unbestimmter Herkunft und Bedeutung auf.

Virus der infektiösen bovinen Rhinotracheitis (IBR); Virus der bovinen Herpes-Mammilitis (BHM); Elektronenmikroskopie; ultradünne Schnitte; Zellkulturen; Organkultur

Adresa autorů:

MVDr. L. Valíček, MVDr. B. Šmíd, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

Výběr z přírůstků

Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTI

z úseku veterinární medicína

Uvedené publikace je možné si zapůjčit osobně nebo písemně v ÚZLK, výpůjční oddělení, 120 56 Praha 2, Slezská 7. Výpůjční doba: pondělí až pátek od 9 do 18 hodin. U každé žádané publikace uveďte signaturu.

GARKAVYJ, F. L.

E 37.455

Selekcija korov i mašinnoje dojenje. Moskva, Kolos 1974. 159 s. 49 tab. 30 obr. (Dojnice — laktace — fyziologické otázky / Dojnice — plemenný výběr — užítkovost — vztahy / Dojnice — plemenitba — SSSR — příručky)

LINDHOLM, A.

D 63.278

Muscle morphology and metabolism in standardbred horses at rest and during exercise. Stockholm, Depart. of Clinical biochemistry 1974. 29 s. 1 obr. tab. (Kůň — svaly — morfologie — výzkum / Svaly — kůň — látková přeměna — výzkum — Švédsko)

E 36.811

Imunitet sel'skochozjajstvennych životnych. Moskva, Kolos 1973. 454 s. (Imunita hospodářských zvířat — sborníky — SSSR)

GERBERT, U. Dž.

D 63.718

Veterinarnaja imunologija. Moskva, Kolos 1974. 310 s. obr. (Veterinární imunologie — příručky)

D 57.157/63

Current topics in microbiology and immunology. Ergebnisse der Mikrobiologie und Immunitätsforschung. 63. Berlin, Springer-Verlag 1974. 219 s. 40 obr. (Veterinární mikrobiologie a imunologie — sborníky)

HALLIWELL, R. E. W.

D 62.880/102

The immunology of allergic skin disease. London, School of veterinary medicine 1971. 431-443 s. 10 obr. J. small Anim. Pract. (1971). 12. (Veterinární imunologie — nemoci kožní — výzkum — Anglie)

KARELIN, A. I. — JEMELJANOV, B. M.

E 32.262/813

Vlijanije vnešnich faktorov na obščuju rezistentnost' i immunobiologičeskuju reaktivnost' organizma porosjat. Moskva, VNIITEISCH 1974. 49 s. tab. Obzornaja informacija 813. (Selata — nemoci — odolnost — prostředí — vliv — studijní zprávy — SSSR)

WIESNER, E. — WILLER, S.

D 63.170

Veterinärmedizinische Pathogenetik. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag 1974. 478 s. 119 obr. 53 tab. (Veterinární patologie — příručka)

ASTRACHANCEV, V. I.

D 63.564

Bolezni pušnych zverej. Moskva, Kolos 1973. 357 s. obr. tab. (Kožišinová zvířata — nemoci — příručky)

KORIKOV, P. N.

E 37.098

Pnevmonii jegnjat. Moskva, Kolos 1974. 175 s. (Jehňata — nemoci — plicní zánět — příručky)

GENETICKÝ PODÍL NA SLOŽENÍ LIPIDŮ LAKTOSEBA BOVINNÍHO STRUKOVÉHO KANÁLKU

M. Šťavíková, I. Ingr, L. Lojda

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

ŠTAVÍKOVÁ M., INGR I., LOJDA L. *Genetický podíl na složení lipidů laktoseba bovinního strukového kanálku*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 679-687, 1975.

Na souborech dvojic matka-dcera, dvojčatech a skupinách polosester po otcích byl studován podíl genotypu na skladě lipidů laktoseba. Kvantitativní zastoupení jednotlivých mastných kyselin má vztah k různé náchylnosti či rezistenci skotu k onemocnění mastitidou. Ze šesti nejvíce zastoupených mastných kyselin v laktosebu vykazaly nejtěsnější vztah mezi příbuznými jedinci kyselina laurová, palmitová a stearová. Ve skupině dvojčat pak, kde byla příbuznost ze sledovaných skupin zvířat nejvyšší, byly úzké vztahy prokázány navíc u kyseliny myristové. Rovněž u kyseliny linolové a olejové byla zjištěna korelace jak mezi matkou a dcerou, tak mezi dvojčaty. Na skladbě lipidní frakce laktoseba, podobně jako na skladbě mléčného tuku, se podílejí jednak vlivy genotypu, jednak však i vlivy prostředí. Dědivost složení lipidů vzhledem k rezistenci vůči onemocnění lze v průměru označit jako středně vysokou.

skot; dědivost; mastitida; mastné kyseliny; rezistence

Zdravotní stav mléčné žlázy je výslednicí působení mnoha vnějších i vnitřních faktorů, v nichž nemalou úlohu hraje dědičnost. V posledních letech se začíná věnovat této důležité otázce více pozornosti. Není to práce snadná, neboť chybí vhodná kritéria, která by umožnila v poměrně mladém věku krav, kdy se ještě mastitida neprojeví, diferencovat zvířata rezistentní od vnímavých. Tato snaha nás vedla ke studiu některých morfologických a funkčních vlastností mléčné žlázy, u nichž předpokládáme pozitivní či negativní vztah k onemocnění mastitidou (Lojda, 1972). Mimo to jsme navázali na poznatky Adamse a Rickarda (1963) a pokusili jsme se rozlišit krávy rezistentní a vnímavé ke streptokokové mastitidě analýzou lipidní frakce látky, která je obsažena ve strukovém kanálku a byla označena jako laktosebum (Lojda aj., 1974). V první etapě těchto pokusů jsme dospěli k pozoruhodným závěrům, že ve skladbě estericky vázaných mastných kyselin laktoseba strukového kanálku rezistentních krav byl nalezen signifikantně vyšší obsah kyseliny laurové a myristové než u krav vnímavých. U těch naopak byl zjištěn signifikantně vyšší obsah kyseliny olejové a linolové ve srovnání s kravami rezistentními. Dále pak v laktosebu krav vnímavých byl stanoven vyšší obsah volných mastných kyselin než u krav rezistentních.

Tyto poznatky nás přivedly k nutnosti řešit další velmi závažné otázky, do jaké míry je skladba mastných kyselin laktoseba strukového kanálku podmíněna geneticky. Bohužel v dostupné literatuře se nám nepodařilo najít údaje týkající se tohoto problému, existují pouze ojedinělé práce o genetickém podílu na vlastnostech mléčného tuku. Tak Winzenried (1955) vyšetřením 14 párů krav-monozygotních dvojčat udává vliv otců-býků na jednotlivé hodnoty určující vlastnosti mléčného tuku: číslo Reichertovo-Meisslovo, číslo Polenského, číslo zmýdelnění, číslo jódové a refrakci. Odhadl heritabilitu těchto hodnot metodou stanovení koeficientu vnitrotřídní korelace a uvádí h^2 v rozmezí 0,62 a 0,89. Výsledky Winzenrieda (1955) byly potvrzeny McDowallem a Patchellem (1958), kterým se podařilo prokázat – v důsledku standardizace podmínek prostředí – statisticky vysoce průkazný vliv býků na vlastnosti mléčného tuku u sedmi párů monozygotních dvojčat.

Kosmáček (1973) studoval genetický podíl skladby mastných kyselin v mléce krav v první laktaci, které byly polosestrami po 10 býcích. Zjistil, že v průběhu laktace vykazují mastné kyseliny mezi různými skupinami geneticky podmíněné rozdíly jak v podílu zastoupení, tak také v množství. Vypočítal koeficienty heritability pro celkový podíl mastných kyselin v tuku (a), dále pro obsah těchto kyselin v 1 litru mléka (b) a pro jejich množství za celou laktaci (c).

Pro mastné kyseliny s krátkým řetězcem (C_4 - C_8) byl odhad heritability v průměru:

- a) $h^2 = 0,28$ b) $h^2 = 0,29$ c) $h^2 = 0,44$

Pro mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (C_{10} - C_{16}):

- a) $h^2 = 0,10$ b) $h^2 = 0,18$ c) $h^2 = 0,35$

Pro nenasycené mastné kyseliny C_{18} :

- a) $h^2 = 0,11$ b) $h^2 = 0,18$ c) $h^2 = 0,01$

Odras zdravotního stavu mléčné žlázy na skladbě jednotlivých mastných kyselin glyceridů mléka studoval Dos Santos (1973). Zjistil, že pouze klinická mastitida se projevuje vysokou variabilitou zejména vyšších nenasycených mastných kyselin. Nejvíce byl zvýšen obsah kyseliny olejové, palmitové a linolové. U subklinických a experimentálně vyvolaných mastitid změnu zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku nezjistil. Ingr (1973) zaznamenal signifikantní rozdíly ve skladbě mastných kyselin mléčného tuku teprve při vyšší stupni pozitivitě zjištěné Mastitis testem NK a při buněčném obsahu vyšším než 2,5 mil. v 1 ml.

MATERIAL A METODA

Problematika byla studována vyšetřením a porovnáním skladby laktoseba:

- u 31 dvojice krav matka-dcera ve dvou zemědělských závodech (A a B),
- u 12 párů krav-dvojčat z různých zemědělských podniků,
- u skupin dcer-polosester pocházejících od pěti různých býků a umístěných ve dvou zemědělských podnicích.

Vzorky laktoseba byly odebírány a analyzovány v období říjen až červen, tedy při různých způsobech krmení. Zdravotní stav mléčné žlázy byl posuzován jednak klinicky, dále Mastitis testem NK a u většiny krav byly známy několikileté výsledky bakteriologického vyšetření čtvrtových vzorků mléka.

Vlastní odběr, zpracování i analýzy laktoseba byly prováděny stejně jako v práci předcházející (Lojda aj., 1974).

Závislost vztahu „matka-dcera“ byla statisticky hodnocena jednak tzv. Spearmanovým koeficientem korelace (Reisenauer, 1970), jednak byl podíl genotypu na skladbě mastných kyselin odhadován na základě regresního koeficientu podle Fewsóna (1965). Stupeň příbuznosti mezi rodiči a potomky je dán v tomto případě koeficientem $1/2$, proto je nutné k získání koeficientu heritability násobit regresní koeficient dvěma.

Dvojčata byla hodnocena tzv. koeficientem vnitrotřídní korelace (Vogel, 1961).

Soubory dcer po jednotlivých otcích byly statisticky zpracovány za použití neparametrického V-testu (Rod, 1966).

VÝSLEDKY

V neutrální frakci lipidů laktoseba strukového kanálku převládají kyseliny: laurová, myristová, palmitová, stearová, olejová a linolová, které tvoří asi 90 % této frakce. Proto byly ve všech pokusných skupinách hodnoceny vztahy těchto šesti nejzastoupenějších mastných kyselin.

I. Hodnocení vztahu „matka—dcera“ v obsahu hlavních mastných kyselin ve frakci neutrálních lipidů laktoseba strukového kanálku krav; hodnoty koeficientů pořadové korelace R (Spearmanův koeficient korelace)

Hledisko (výběr párů)	Kyselina						Počet párů (n)
	laurová	myristová	palmitová	stearová	olejová	linolová	
1.	0,404	0,142	0,052	-0,358	0,617b	0,322	14
2.	0,428b	-0,040	0,150	-0,050	0,170	0,617 ^a	31
3.	0,413	-0,078	0,140	-0,040	-0,202	0,338	17
4.	0,245	-0,282	0,215	0,153	-0,020	0,540b	18
5.	0,242	0,033	0,283	0,280	-0,213	0,546 ^c	12
6.	1,000b	-0,300	0,300	-0,175	0,375	1,000b	5
7.	0,223	0,600	-0,500	0,679	0,428	0,170	7
8.	0,658	0,415	0,658	-0,258	0,715	0,365	6

^a... P 0,01 ^b... P 0,05 ^c... na hranici 5% významnosti

Legenda

Hlediska pro výběr páru

1. Všechny použitelné výsledky analýz vzorků odebraných v zemědělském závodě A
2. Všechny použitelné výsledky analýz vzorků odebraných v závodě A i B
3. Všechny použitelné výsledky analýz vzorků odebraných v závodě B
4. Výběr párů s negativním bakteriálním nálezem u matky a dcery
5. Výběr párů s negativním bakteriálním nálezem a s negativním Mastitis testem NK u matky i dcery
6. Výběr párů s pozitivním bakteriálním nálezem u matky i dcery
7. Výběr párů s rozdílnými bakteriálními nálezy u matky i dcery
8. Výběr párů, kdy matka měla pozitivní bakteriální nález a negativní Mastitis test NK a dcera měla negativní bakteriální nález i Mastitis test NK

a) Dvojice krav matka-dcera byly při statistickém hodnocení zařazeny do různých skupin podle lokalit a podle bakteriologického nálezu v mléce i vyšetření Mastitis testem NK, jak je uvedeno v seznamu hledisek pro výběr párů (legenda k tab. I). Podle jednotlivých vztahů byly hodnoceny jen ty výběry, u kterých počet užitých párů dosahoval minimálně pěti. Ostatní výběry byly posouzeny jen pro úplnost. Z různých hledisek bylo hodnoceno proto, že byly vyloučeny případné vlivy, které by mohly být způsobené dřívějším onemocněním mléčné žlázy. Nejtěsnějšího pozitivního vztahu bylo dosaženo v obsahu kyseliny linolové, laurové a olejové (tab. I).

Rovněž u těchto tří kyselin byly vypočítány středně vysoké koeficienty heritability, které se pohybovaly v rozmezí 0,38 až 0,58. U ostatních kyselin byly zjištěny hodnoty nižší.

II. Analýza variance nejzastoupenějších mastných kyselin v laktosebu (Srovnání dvojčat s populací)

Název mastné kyseliny		$\Sigma (x_1 - \bar{x})^2$	Variance S^2	Směrodatná odchylka S	Koeficient vnitrotřídní korelace r
$C_{12} : 0$ laurová	A	1,27	0,14	0,374	0,241
	B	1,85	0,23	0,480	
$C_{14} : 0$ myristová	A	65,65	5,47	2,339	0,431
	B	151,07	13,73	3,705	
$C_{16} : 0$ palmitová	A	79,23	6,60	2,569	0,685
	B	388,74	35,34	5,945	
$C_{18} : 0$ stearová	A	91,74	7,64	2,764	0,809
	B	795,44	72,31	8,504	
$C_{18} : 1$ olejová	A	193,18	16,10	4,012	0,230
	B	282,83	25,71	5,071	
$C_{18} : 2$ linolová	A	8,91	0,81	0,900	0,361
	B	17,24	1,72	1,311	

A — uvnitř párů

B — mezi páry

b) Ve druhé fázi pokusů byla analyzována neutrální frakce lipidů laktoseba krav-dizygotních dvojčat. V tab. II jsou uvedeny výsledky analýzy variance nejvíce zastoupených mastných kyselin. Zvláště u kyseliny myristové, palmitové a stearové je variabilita uvnitř jednotlivých párů podstatně nižší než variabilita mezi páry. Pomocí F testu při 1% hladině pravděpodobnosti jsme zjistili, že vysoce významná korelace mezi dvojčaty je u kyseliny palmitové a stearové.

c) Jako poslední jsme analyzovali laktosebum u pěti skupin dcer-polosester. Do hodnocení jsme zahrnuli celkem 72 vzorky, u kterých bylo opět statisticky posuzováno šest v laktosebu nejzastoupenějších mastných kyselin jako v pokusech předchozích. Byly hodnoceny soubory dcer jednotlivých býků. U každé mastné kyseliny bylo provedeno 10 možných kombinací. V jednotlivých skupinách byl počítán aritmetický průměr ($\bar{x}$), minimální a maximální hodnoty souboru, a tím bylo vyjádřeno variační

rozpětí souboru. Výsledky jsou uvedeny v tab. III. Statisticky průkazný vliv otce na složení neutrální frakce lipidů byl zjištěn u kyseliny laurové, palmitové a stearové (tab. IV).

III. Obsah hlavních mastných kyselin neutrální frakce lipidů laktoseba strukového kanálku polosester po různých otcích

Otec (počet dcer n) základní statistické charakteristiky	Mastné kyseliny (%)					
	laurová 12 : 0	myristová 14 : 0	palmitová 16 : 0	stearová 18 : 0	olejová 18 : 1	linolová 18 : 2
Lm 28 ($n = 18$)						
$\bar{x}$	2,47	9,31	27,32	15,96	36,28	3,70
x_{min}	0,30	6,40	21,10	10,30	29,57	2,10
x_{max}	4,50	11,60	39,00	21,30	41,30	6,40
Lm 32 ($n = 18$)						
$\bar{x}$	1,86	8,36	26,30	15,78	37,97	3,30
x_{min}	0,30	2,93	19,62	12,18	30,32	1,50
x_{max}	4,11	12,04	34,10	22,90	46,79	5,60
Lm 33 ($n = 14$)						
$\bar{x}$	1,38	8,56	29,97	14,42	37,86	3,26
x_{min}	0,30	5,80	24,30	11,90	29,20	1,60
x_{max}	4,10	12,50	35,40	19,40	43,80	5,80
Ps 182 ($n = 14$)						
$\bar{x}$	1,49	8,99	29,65	14,76	36,96	3,68
x_{min}	0,50	5,50	21,60	6,60	26,90	2,10
x_{max}	4,80	14,80	38,20	18,40	40,80	5,60
Cs 735 ($n = 8$)						
$\bar{x}$	2,04	9,96	29,59	14,46	37,20	3,14
x_{min}	0,60	7,80	23,80	10,90	31,80	1,20
x_{max}	3,60	13,50	32,80	18,50	40,60	4,40

DISKUSE

Na základě výsledků prací A d a m s e a R i c k a r d a (1963) a T r e e c e aj. (1964) předpokládáme, že mastné kyseliny laktoseba bovinního strukového kanálku jsou nositelem antibakteriálního účinku. Přesto však připouštíme úvahu, že změna skladby esterifikovaných mastných kyselin laktoseba by mohla být ovlivněna i podmínkami zevního prostředí, popřípadě i infekcí *Sc. agalactiae* a působením jeho lipáz. Pro inhi-

IV. Statistické hodnocení vlivu otců na obsah mastných kyselin neutrální frakce lipidů laktoseba dcer-polosester (jsou uvedeny pouze mastné kyseliny, u nichž byly zjištěny signifikantní odlišnosti)

	Lm 28	Lm 32	Lm 33	Cs 735	Ps 182
Kyselina laurová 12 : 0					
Lm 28			++		+
Lm 32					
Lm 33	++				
Cs 735					
PS 182	+				
Kyselina palmitová 16 : 0					
Lm 28			+		
Lm 32			++	+	+
Lm 33	+	++			
Cs 735		+			
Ps 182		+			
Kyselina stearová 18 : 0					
Lm 28			+		
Lm 32		+			
Lm 33					
Cs 735					
Ps 182					

++ výběry se signifikantně liší na hladině významnosti $P = 0,01$

+ výběry se signifikantně liší na hladině významnosti $P = 0,05$

bičníc působení mastných kyselin na *Sc. agalactiae* ve strukovém kanálku však hovoří rovněž výsledky práce Willetta a Morseho (1966). Také Galbraith aj. (1971) *in vitro* prokázali, že grampozitivní bakterie jsou inhibovány mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem. Uvádějí, že z nasycených kyselin má nejvyšší antibakteriální aktivitu kyselina laurová, což odpovídá našim nálezům, neboť u rezistentních krav byl v laktosebu nalezen vyšší obsah kyseliny laurové a myristové než u krav vnímavých. Na druhé straně však citovaní pracovníci zjistili z nenasyčených mastných kyselin nejvyšší antibakteriální aktivitu u kyseliny olejové a linolové, což jsme v naší předchozí práci nepotvrdili (Lojda aj., 1974).

Za předpokladu, že mastné kyseliny laktoseba mohou být jednou z příčin zvýšené rezistence krav vůči mastitidě, je žádoucí znát genetický podíl na skladbě laktoseba. Vztah genotypu ke skladbě laktoseba jsme vyhodnotili několika metodami. Při zjišťování vztahu mezi matkou a dcerou po statistickém vyhodnocení tzv. Spearmanovým koeficientem je nej-

těsnější pozitivní vztah u kyseliny laurové a linolové. U výběrů označených 7 a 8, které byly hodnoceny jen pro úplnost, nepřekvapuje, že nebyla prokázána statisticky významná závislost, neboť charakteristiky matek a dcer byly protichůdné: negativní-pozitivní ve smyslu bakteriologického nebo cytologického nálezu v mléce. Ačkoliv počet vyhodnocených párů z hlediska zjišťování koeficientu heritability byl nízký, přesto byly pro kyselinu laurovou a linolovou vypočítány vysoké hodnoty. Významná heritabilita přísluší i kyselině olejové. Je překvapující, že právě u těchto tří kyselin, jimž přisuzují Galbraith aj. (1971) značnou inhibiční schopnost proti grampozitivním bakteriím, jsme stanovili metodou korelace matka-dcera nejtěsnější vztah.

Při posuzování korelace výskytu mastných kyselin v laktosebu dvojčat je z tab. II na první pohled patrné, že proměnlivost hladin všech mastných kyselin, zvláště pak kyselin myristové, palmitové a stearové, je mezi páry vyšší než uvnitř jednotlivých párů dvojčat. Ovšem při testování významnosti rozdílu F testem při 1% hladině pravděpodobnosti jsme zjistili vysoce významnou korelaci mezi dvojčaty pouze u kyseliny palmitové a stearové. Domníváme se, že větší variabilita ostatních kyselin je způsobena jednak tím, že se jedná vesměs o dizygotní dvojčata, jednak tím, že byl sledován poměrně malý počet párů, neboť výskyt dospělých dvojčat-krav je vzácný a kritické hodnoty F rozložení pro 11 a 12 stupňů volnosti (počet párů) jsou značně vysoké.

Při sledování vlivu otce na složení neutrální frakce lipidů byly nalezeny podobně jako u dvojic matka-dcera kladné vztahy zejména u kyseliny laurové. Podobně jako u párů dvojčat byl nalezen statisticky významný vliv otců hlavně u kyseliny palmitové a stearové.

Shrneme-li výsledky tří různých způsobů hodnocení vztahů uvedenými metodami, je nutné konstatovat, že ze šesti nejzastoupenějších mastných kyselin v laktosebu jsou kyseliny laurová, palmitová a stearová nejvíce souhlasné u jedinců v různém stupni příbuznosti. U dvojčat, kde je příbuznost nejvyšší, byly nalezeny ještě navíc souhlasné nálezy u kyseliny myristové. Rovněž u kyseliny linolové, jejíž množství bývá vyšší u krav vnímavých spolu s kyselinou olejovou, byl zjištěn značně vysoký podíl genotypu ($h^2 = 0,58$) na základě regresního koeficientu metodou matka-dcera a také u dvojčat byl vypočítán koeficient vnitrotřídní korelace pro tuto kyselinu linolovou středně vysoký ($r = 0,36$). Pro kyselinu olejovou byl vypočítán odhad heritability $h^2 = 0,38$.

Ze zjištěných výsledků lze vyvodit, že na skladbě mastných kyselin laktoseba se sice podílí dosti významným způsobem genotyp, ale rozhodně podléhají, podobně jako složení mastných kyselin mléčného tuku, vlivu podmínek prostředí. K obdobným závěrům dospěl ve své disertační práci Kosmáček (1973), který však studoval otázky vlivu genotypu na skladbu mastných kyselin v mléčném tuku, nikoliv v laktosebu. Uvádí, že vedle genetických vlivů se dal prokázat významnou měrou i vliv stáří při prvním otelení, vliv výživy a ostatních podmínek prostředí.

Některá námi zjištěná poměrně velká rozpětí hodnot jednotlivých mastných kyselin lze přisuzovat také intravitálním faktorům. Rovněž lze připustit, že při získávání laktoseba mohlo přes pečlivý odběr dojít ke kontaminaci mléčným tukem, zvláště při značném naplnění mléčné žlázy. Podle našich zkušeností je nejlépe odebírat laktosebum dvě až tři

hodiny po ranním dojení. Těmito faktory by bylo možné vysvětlit některé disproporce našich výsledků při zjišťování podílu dědivosti na skladbě neutrální frakce lipidů laktoseba strukového kanálku. Případné ovlivnění skladby mastných kyselin změněným mlékem při klinické mastitidě, jak uvádí Dos Santos (1973), nepřipadá v úvahu, neboť laktosebum bylo odebíráno vždy z klinicky zdravých struků.

Za technickou spolupráci děkujeme H. Mertové a J. Poláčkovi.

Literatura

- ADAMS, E. W. — RICKARD, CH. G.: The antistreptococcal activity of bovine teat canal keratin. *Am. J. vet. Res.*, 24, 1963, s. 122-135.
- FEWSON, D.: *Haustiergenetik*. Hohenheim 1965.
- GALBRAITH, H. — MILLER, T. B. — PATON, A. M. — THOMPSON, I. K.: Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *J. appl. Bact.*, 34, 1971, s. 803-813.
- INGR, I.: Zusammensetzung und Eigenschaften des Kuhmilchfettes bei subklinischen Mastitiden. *Nahrung*, 17, 1973, s. 215-223.
- KOSMACK, U.: Genetische Aspekte zur Fettsäurezusammensetzung der Milch. [Diss.] Gießen 1973.
- LOJDA, L.: Studium morfologických a funkčních úchylek mléčné žlázy skotu ve vztahu k jejich genetické podmíněnosti a k onemocnění mléčné žlázy. [Výzkumná zpráva.] Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno 1972.
- LOJDA, L. — INGR, I. — ŠTAVÍKOVÁ, M. — HLAVICA, M.: Možnosti rozlišení rezistentních a vnímavých krav ke streptokokové mastitidě analýzou lipidů laktoseba strukového kanálku. *Vet. Med. (Praha)* 19, 1974, č. 2, s. 71-80.
- MC DOWALL, F. H. — PATCHELL, M. R.: 1958. Cit.: KOSMACK, U.: Genetische Aspekte zur Fettsäurezusammensetzung der Milch. [Diss.] Gießen 1973.
- REISENAUER, R.: Metody matematické statistiky a jejich aplikace v technice. Praha 1970.
- ROD, J.: *Statistika. Základy biometrie*. Praha 1966.
- SANTOS DOS, E. C.: Effect of mastitis on fatty acid composition of the glycerids of milk. *Arqs Esc. Vet. Minas Gerais*, 25, 1973, s. 99-106.
- TREECE, J. M. — MORSE, G. — SHAH, P. C.: Basic studies of bovine mastitis II. Chemical composition of teat canal soft keratin. *J. Dairy Sci.*, 47, 1964, s. 697-701.
- VOGEL, F.: *Lehrbuch der allgemeinen Humangenetik*. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1961.
- WILLETT, N. P. — MORSE, G. E.: Long chain fatty acids and inhibition of *Streptococcus agalactiae* in a chemically defined medium. *J. Bact.*, 91, 1966, s. 2245-2249.
- WINZENRIED, H. U.: 1955. Cit.: KOSMACK, U.: Genetische Aspekte zur Fettsäurezusammensetzung der Milch. [Diss.] Gießen 1973.

Došlo dne 12. 6. 1975

ШТАВИКОВА М., ИНГР И., ЛОЙДА Л. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Участие генотипа в составе липидов лaktoseба в сосковом канале. *Vet. Med. (Praha)* 20 (10-11) : 679-687, 1975.

В группах пар мать-дочь, на двойнях и в группах полусестер по отцу изучали долю генотипа в составе липидов лaktoseба. Количественное участие отдельных жирных кислот связано с разной восприимчивостью или устойчивостью коров к маститу. Из 6 самых распространенных жирных кислот в лaktoseбе между родственными особями наиболее тесное соотношение показали лавровая, пальмитиновая и стеариновая кислоты. А в группе двоен, с наи-

большим родством, — в добавок и между упомянутыми и миристиновой кислотами. Также между линоленовой и олеиновой кислотами установлена корреляция как между матерью и дочерью, так и между двойнями. В составе липидной фракции лактосеба, как и молочного жира, участвует как влияние генотипа, так и среды. Ввиду устойчивости к заболеванию наследуемость состава липидов можно обозначить средневысокой.

крупный рогатый скот; наследуемость; жирные кислоты; устойчивость

ŠTAVÍKOVÁ M., INGR I., LOJDA L. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). *The Genetic Share in the Composition of the Lactosebum Lipids of the Bovine Teat Canal*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 679-687, 1975.

In experimental sets consisting of mother-daughter, twins and groups of half-sisters from the same father, the authors studied the share of the genotype in the composition of the lactosebic lipids. The quantitative proportion of the different fatty acids is directly related to the susceptibility or resistance of the cattle to mastitis. Out of the six most frequently occurring fatty acids in the lactosebum it was found that related individuals showed closest values in lauric acid, palmitic acid and stearic acid. In the group of twins, where the relationship was closest, closest values were moreover found also in myristic acid. The same applies to linoleic acid and oleic acid, where correlation was found between mother and daughter as well as between twins. The composition of the lactosebic fraction, just as of the lactic fat, is partly due to the genotype and partly to the effect of the environment. The heritability of lipid composition, with a view to resistance to diseases, can be considered relatively high.

cattle; heritability; mastitis; fatty acids; resistance

ŠTAVÍKOVÁ M., INGR I., LOJDA L. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Genetischer Anteil an der Zusammensetzung der Lipide des Laktosebums des bovinen Zitzenkanälchens*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 679-687, 1975.

Bei Gruppen von Mutter-Töchter-Paaren, Zwillingen und Gruppen von Halbschwestern nach den Vätern wurde der Anteil des Genotyps an der Zusammensetzung der Lipide des Laktosebs untersucht. Die quantitative Vertretung der einzelnen Fettsäuren steht in Beziehung zu einer unterschiedlichen Anfälligkeit oder Resistenz der Rinder gegen Erkrankungen an Mastitis. Von den sechs im Laktoseb am meisten vertretenen Fettsäuren wiesen die engsten Beziehungen zwischen den verwandten Tieren die Laurinsäure, die Palmitinsäure und die Stearinsäure auf. Bei der Zwillingsgruppe, wo die Verwandtschaft von allen untersuchten Tiergruppen am höchsten war, wurden darüber hinaus enge Beziehungen auch bei der Myristinsäure nachgewiesen. Auch bei der Linolsäure und der Ölsäure wurden Korrelationen sowohl zwischen Mutter und Tochter, als auch zwischen Zwillingen festgestellt. An der Zusammensetzung der Lipidfraktion des Laktosebs, ähnlich wie an der Zusammensetzung des Milchfettes beteiligen sich sowohl Einflüsse des Genotyps, als auch Einflüsse des Milieus. Die Heritabilität der Zusammensetzung der Lipide mit Bezug auf die Resistenz gegen Krankheiten kann man im Durchschnitt als mittelhoch bezeichnen.

Rind; Heritabilität; Mastitis; Fettsäuren; Resistenz

Adresa autorů:

Ing. M. Štavíková, CSc., ing. I. Ingr, CSc., MVDr. L. Lojda, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno - Medlánky

Výběr z přírůstků

Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTI

z úseku veterinární medicína

Uvedené publikace je možné si zapůjčit osobně nebo písemně v ÚZLK, výpůjční oddělení, 120 56 Praha 2, Slezská 7. Výpůjční doba: pondělí až pátek od 9 do 18 hodin. U každé žádané publikace uveďte signaturu.

NAIR, M. K.

D 34.761/42

The early inflammatory reaction in the fowl. A light microscopical, ultrastructural and autoradiographic study. Stockholm, Royal veterinary college 1973. 103 s. 61 obr. 5 tab. Acta veterinaria scandinavica 42. (Drůbež — nemoci — záněty — výzkum — Švédsko)

MUTOVIN, V. I.

E 37.442

Bořba s mastitami korov. Moskva, Kolos 1974. 253 s. 25 obr. tab. (Mastitis — dojnice — diagnostika — metody — příručky / Dojnice — nemoci — mastitis — léčení — příručky)

OJEDA RODRIGUEZ, J.

E 13.401/1974/8

Mamitis bovinas. Madrid, Min de agricultura 1974. 16 s. obr. Hojas divulgadoras 8/1974. (Mastitis — dojnice)

D 39.169/605

Relation of clinical and subclinical mastitis to milk production and composition. Las Cruces (New Mexico), Agric. exp. station 1973. 28 s. 16 obr. 8 tab. Bulletin 605. (Dojnice — nemoci — mastitis — mléko — složení — vztahy — výzkum / Dojnice — mléčná užitkovost — vztahy — výzkum — USA)

SEIDEL, H. — GÜRTLER, H.

E 36.989

Weidetetanie. Jena, VEB Gustav Fischer 1974. 171 s. 51 tab. (Tetanie travní — příručky)

BARTA, A. L. — KOHLER, E. M. — UNDERWOOD, J. F.

D 28.422/193

A study of the grass tetany syndrome in Ohio. Wooster (Ohio), Agric. research and dev. center 1973. 15 s. 2 obr. 5 tab. Research circular 193. (Skot — nemoci — tetanie travní — USA — Ohio — výzkum)

FIJAŁKOWSKA, W.

E 37.417

Czym moga zarazić nas zwierzęta? Warszawa, PWRiL 1975. 238 s. 73 obr. (Nakažlivé nemoci — zvířata — příručky / Zvířata — nakažlivé nemoci — člověk — příručky)

D 31.783/390

Rinderkrankheiten. Bonn, Land- u. Hauswirtsch. Auswertungs u. Informationsdienst 1975. 31 s. 29 obr. AID 390. (Skot — nemoci nakažlivé / Skot — nemoci fyziologické)

PICK, M.

D 64.575

Handbuch der Pferdenkrankheiten. Ursache, Diagnose Behandlung. Stuttgart, Franckh'sche Verlagshandlung 1974. 188 s. 54 obr. (Kůň — nemoci nakažlivé — příručky)

ÚČINEK NĚKTERÝCH PSYCHOFARMAK NA HEMATOLOGICKOU STRESSOVOU ODPOVĚĚ U SELAT

M. Dvořák, J. Raszyk

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

DVOŘÁK M., RASZYK J. Účinek některých psychofarmak na hematologickou stressovou odpověď u selat. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 689-699, 1975.

U čtyř skupin odstavených selat byly sledovány po čtyři hodiny sedativní a stressové účinky šesti intramuskulárně podaných psychofarmak ve srovnání s kontrolní aplikací fyziologického roztoku. Dobré zklidnění vyvolané Stresnilem a Clotepinem bylo doprovázeno hematologickými příznaky zvýšené funkce kůry nadledvin. Podobně i chlorprothixen vyvolával větší eosinopenii a lymfopenii než byla u kontrol; rozdíl však nebyl, podobně jako po chlorpromazinu, statisticky průkazný. Dávka 0,10 mg kg⁻¹ diazepamů jevila tendenci ke stimulaci, dávka 0,25 mg kg⁻¹ k tlumení adrenokortikální aktivity. Spolehlivě zeslaboval hematologickou stressovou odpověď na použitou manipulaci se selaty fenobarbital v množství 2,0 a 5,0 mg kg⁻¹, jehož zklidňující účinek však nedosáhl stupně zjištěného po aplikaci jiných testovaných farmak. Je upozorněno na to, že při vzrušení zvířat některá neuroleptika sice dobře mohou tlumit vnější příznaky tohoto stressového stavu, ne však současně zvýšenou sekreci kortikosteroidů.

Stresnil; Clotepin; chlorprothixen; diazepam; fenobarbital; kůra nadledvin

Velkovýrobní formy chovu hospodářských zvířat kladou na organismus zvýšené požadavky. Nové způsoby ustájení, velké koncentrace zvířat, různé zákroky, zvláště časté přesuny a další změny životních podmínek, působí nepříznivě. Snižuje se užitkovost, což je vysvětlováno nedokonalou adaptací a zejména sociálními interakcemi ve skupinách zvířat, zvýšenou reakcí na zásahy člověka a zvýšenou odpovědí na nové faktory prostředí. Velmi často se v této souvislosti mluví o stressu nebo zátěži, mnohdy o sociálním nebo psychickém stressu.

Téměř 20 let jsou zkoušeny a uplatňovány různé látky, souhrnně označované jako trankvilizační, mající u hospodářských zvířat redukovat nepříznivé důsledky stressu, vyvolat uklidnění a zvýšení přírůstků hmotnosti těla ve výkrmu (Aušková, 1966, Symoens, 1970, Aušková aj., 1971, Jones, 1972, Völker aj., 1974, Brož, 1974). S různými – mnohdy nestejnými – výsledky byla zkoušena velká řada látek zahrnovaných zejména do skupin neuroleptik, ataraktik i hypnotik. Podle chemického složení udává jejich použití u zvířat přehledně Martinek (1968).

Zavedení některé trankvilizační látky do živočišné výroby není jednoduchá záležitost. Vystupují do popředí otázky účinku, který může

být druhově specifický, dále hlediska zdravotní nezávadnosti a v neposlední řadě komerční přístupnosti. Ačkoliv jsou tyto přípravky často označovány jako antistressové, bylo dosud věnováno málo pozornosti jejich účinku na funkci kůry nadledvin, která se v Selyeho pojetí stressu (Raszyka a Dvořák, 1971) podílí zvýšenou sekrecí glukokortikoidů na odezvě organismu při působení stressorů. Tyto hormony mobilizují energetické zdroje pro obranu, současně však svými katabolickými účinky negativně ovlivňují hmotnost těla. Celá řada farmak stimuluje tvorbu adrenokortikálních steroidů, jiná jejich hladinu snižují (Selye, 1946, Christy aj., 1957, deWied, 1967, Soulaire aj., 1972, Merry a Marks, 1972, Borrell aj., 1974).

Cílem předložené práce je zjistit působení některých psychofarmak, používaných jako „antistressové“ přípravky ke zklidnění zvířat, nebo přicházejících k tomuto účelu v úvahu, na funkci kůry nadledvin. Jako kritérium její aktivity byly použity změny bílého krevního obrazu, zejména redukce počtu eosinofilních granulocytů a lymfocytů periferní krve, k nimž dochází při stimulaci sekrece glukokortikoidů (Hills aj., 1948, Thorn aj., 1948) a které byly zjištěny také u selat (Dvořák, 1964, 1972, Raszyk, 1974).

MATERIÁL A METODY

Hematologický účinek intramuskulárně aplikovaných psychofarmak byl zjišťován u odstavených selat bílého ušlechtilého plemene, pocházejících z různých chovů. Selata byla ustájena ve VÚVL v dobrých hygienických podmínkách, stále měla volný přístup k sypké krmné směsi a k vodě. Nejevila klinické příznaky onemocnění. Testy byly provedeny u čtyř skupin zvířat, zpravidla opakovaně s několika denními intervaly. V první skupině bylo 39 selat s hmotností těla při testování 14–32 kg, ve druhé skupině 9 selat (10–13 kg), ve třetí skupině 12 selat (8–18 kg) a ve čtvrté skupině 5 selat (10–21 kg).

Byla testována následující farmaka: 1. neuroleptikum azaperon (Stresnil, Janssen Pharmaceutica [Beerse] Belgica) v dávce 1 mg kg⁻¹, 2. neuroleptikum octoclothepein (Clotepin, Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Praha) v dávce 0,15, 0,5 a 1 mg kg⁻¹, 3. neuroleptikum Chlorprothixen (Spofa) v dávce 1 a 2,5 mg kg⁻¹, 4. neuroleptikum chlorpromazin (Plegomazin, Egyesült Gytgyszer – És Tápszergyár, Budapest) v dávce 1 mg kg⁻¹, 5. hypnotikum Phenobarbital (Spofa) v dávce 2 a 5 mg kg⁻¹, 6. antifobikum diazepam (Faustan, VEB Arzneimittelwerk Dresden) v dávce 0,1, 0,15 a 0,25 mg kg⁻¹. Kontrolním selatům byl podáván fyziologický roztok v objemu odpovídajícím objemu testovaných farmak, v dávce nedosahující 1 mg chloridu sodného na kg hmotnosti těla.

Všechny roztoky uvedených přípravků byly aplikovány intramuskulárně bezprostředně po prvním odběru několika kapek krve z ušní vény k hematologickému vyšetření, a to mezi 7. a 8. hodinou ránní. Další vyšetření následovalo za dvě a čtyři hodiny potom. Současně s odběrem krve bylo sledováno chování zvířat vzhledem k očekávanému zklidňujícímu účinku aplikovaných farmak, a to jak při uchopování a další manipulaci se selaty, tak při jejich pohybu v kotci.

Bílý krevní obraz byl stanoven obvyklými způsoby baničkovou metodou při počítání bílých krvinek (BK) v Türekově roztoku a při počítání eosinofilních granulocytů (Eo) metodou podle Pirališviliho (1962). Počet lymfocytů (Ly) byl stanoven přepočtem na základě leukogramu zhotoveného po obarvení krevních nátěrů podle Pappenheima vyšetřením 200 BK. Zjištěné hodnoty jsou udávány v aritmetických průměrech se směrodatnou odchylkou. K posouzení statistické významnosti rozdílů průměrů byl použit Studentův *t* test.

I. Změny počtu bílých krvinek (BK), eosinofilních granulocytů (Eo) a lymfocytů (Ly) v průběhu čtyř hodin po aplikaci psychofarmak nebo fyziologického roztoku selatům

Skupina	Hodina	BK 10^9 l^{-1}	Eo 10^6 l^{-1}	Ly 10^9 l^{-1}
1. Stresnil 1 mg kg ⁻¹	0	21,8 ± 6,0	256 ± 187	11,8 ± 2,0
	2	18,4 ± 5,4	30 ± 32 ^a	6,9 ± 3,4 ^a
	4	17,4 ± 4,2	50 ± 24 ^a	9,0 ± 1,4 ^b
	0	20,7 ± 4,0	185 ± 80	10,7 ± 1,7
	2	16,6 ± 5,4	47 ± 38 ^a	7,3 ± 1,7 ^a
	4	15,0 ± 5,9 ^b	37 ± 42 ^a	7,0 ± 2,3 ^a
	0	22,2 ± 3,3	156 ± 81	11,8 ± 3,3
	2	22,7 ± 6,6	82 ± 27 ^b	11,3 ± 4,0
	4	23,5 ± 5,7	146 ± 47	11,2 ± 3,3
	0	22,5 ± 7,6	214 ± 75	11,5 ± 3,6
	2	17,3 ± 4,1	135 ± 64	9,2 ± 1,9
	4	21,7 ± 7,1	200 ± 66	10,8 ± 2,8
	0	22,2 ± 7,7	288 ± 134	11,4 ± 3,9
	2	14,0 ± 3,3 ^a	65 ± 20 ^a	6,6 ± 1,0 ^b
	4	15,1 ± 3,4	78 ± 107 ^a	6,9 ± 1,8 ^b
	0	20,3 ± 1,4	281 ± 142	11,2 ± 1,4
	2	17,4 ± 4,1	50 ± 21 ^a	8,0 ± 1,0 ^a
	4	15,4 ± 2,4 ^a	29 ± 24 ^a	7,4 ± 1,5 ^a
2. Chlorprothixen 1 mg kg ⁻¹	0	21,5 ± 4,2	291 ± 150	10,9 ± 2,4
	2	20,8 ± 5,1	152 ± 107 ^a	9,5 ± 2,7
	4	20,0 ± 4,2	163 ± 116 ^b	9,6 ± 2,3
	0	18,7 ± 2,5	190 ± 82	11,6 ± 1,7
	2	13,7 ± 2,4 ^a	20 ± 24 ^a	7,9 ± 1,8 ^a
	4	13,9 ± 2,8 ^a	32 ± 41 ^a	8,4 ± 1,9 ^a
	0	19,1 ± 2,9	203 ± 85	11,7 ± 1,4
	2	16,7 ± 2,9	42 ± 41 ^a	9,6 ± 1,3 ^b
	4	16,8 ± 2,2	38 ± 32 ^a	9,9 ± 1,7
	0	21,5 ± 4,2	291 ± 150	10,9 ± 2,4
	2	20,8 ± 5,1	152 ± 107 ^a	9,5 ± 2,7
	4	20,0 ± 4,2	163 ± 116 ^b	9,6 ± 2,3

^a = rozdíl proti výchozí hodnotě vysoce průkazný ($P < 0,01$)

^b = rozdíl proti výchozí hodnotě průkazný ($P < 0,05$)

VÝSLEDKY

Změny bílého krevního obrazu u selat první skupiny byly nejvýraznější po aplikaci Stresnilu, Clotepinu a Clotepinu s fenobarbitalem. Byly charakterizovány snížením počtu BK, výraznou redukcí počtu Eo (tab. I a II), zvýšením procentuálního zastoupení neutrofilních granulocytů (N) a snížením LY. Relativní zvýšení počtu N bylo statisticky průkazné ($P < 0,05$) druhou hodinu po aplikaci Stresnilu a u kontrol. Relativní snížení počtu Ly nebylo sice významné, ale průkazná absolutní lymfopenie byla zaznamenána po aplikaci všech uvedených léčiv (tab. II). Samotný fenobarbital vyvolal menší hematologické změny než kontrolní injekce fyziologického roztoku (tab. I a II). Jedině po aplikaci fenobarbitalu v dávce 5 mg kg^{-1} nedošlo k průkazným změnám ani v počtu Eo periferní krve, jejichž redukce byla nejmenší z celé skupiny. Naproti tomu při současném podání s Clotepinem v dávce $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ nenastalo zřetelné zmírnění hematologických příznaků charakteristických pro zvýšenou sekreci glukokortikoidů a selata jevila v podstatě tutéž redukci Eo i Ly, jakou působil samotný Clotepin v dávce 1 mg kg^{-1} .

Z hlediska sedativního účinku farmak použitých u první skupiny zvířat vyvolal nejvýraznější zklidnění Stresnil. Nastupovalo asi 15 minut po injekci, druhou hodinu bylo stále ještě spolehlivé, ne však již čtvrtou

II. Přehled použitých psychofarmak, jejich dávkování a účinek na změny eosinofil-

Skupina	Přípravek	Dávka na kg
1.	Stresnil	1 mg
	Clotepin	1 mg
	Phenobarbital	2 mg
	Phenobarbital	5 mg
	Clotepin + Phenobarbital	0,5 mg + 2 mg
	Clotepin + Phenobarbital	0,5 mg + 5 mg
	NaCl	<1 mg
2.	Chlorprothixen	1 mg
	NaCl	<1 mg
3.	Clotepin	0,15 mg
	Diazepam	0,15 mg
	Chlorpromazin	1 mg
	NaCl	<1 mg
	NaCl	<1 mg
4.	Diazepam	0,1 mg
	Diazepam	0,25 mg
	Chlorprothixen	2,5 mg
	NaCl	<1 mg

NP = rozdíl statisticky neprůkazný

hodinu. Projevovalo se snížením spontánních pohybů, zvířata zpočátku ležela, při vyrušení však chodila, druhou hodinu se dala snadno uchopit, obranné reflexy však nebyly výrazně utlumeny. Při držení selat a nabodávání ušní cévy druhou hodinu byla zcela klidná, uvolněná. Po aplikaci Clotepinu nastupoval sedativní účinek později, druhou hodinu byl nejzřetelnější a podstatně se nelišil od účinků Stresnilu a čtvrtou hodinu stále ještě trval. Podáním fenobarbitalu v dávce 2 ani 5 mg kg⁻¹ nebylo takového zklidnění dosaženo. Zato však se ukázala jako výhodná kombinace Clotepinu v dávce 0,5 mg kg⁻¹ spolu s fenobarbitalem v dávce 2 i 5 mg kg⁻¹. Plně uspokojivý sedativní účinek nastupoval po 30. minutě a trval druhou i čtvrtou hodinu, kdy se dalo se selaty snadno manipulovat.

Chlorprothixen ve druhé skupině zvířat průkazně snížil počet BK, Eo i Ly v periferní krvi selat (tab. I a II), průkazně ($P < 0,01$) zvýšil procentuální zastoupení N a průkazně ($P < 0,01$) snížil i procentuální zastoupení Ly za dvě hodiny po aplikaci. U kontrol byly zaznamenány podobné změny, avšak menšího stupně. Rozdíly v relativních počtech N a Ly mezi hodnotami při začátku a druhou hodinou testu nebyly statisticky významné.

Chlorprothixen v použité dávce 1 mg kg⁻¹ vyvolal u selat zklidnění, které nedosahovalo stupně zjištěného po Stresnilu nebo Clotepinu. Nastu-

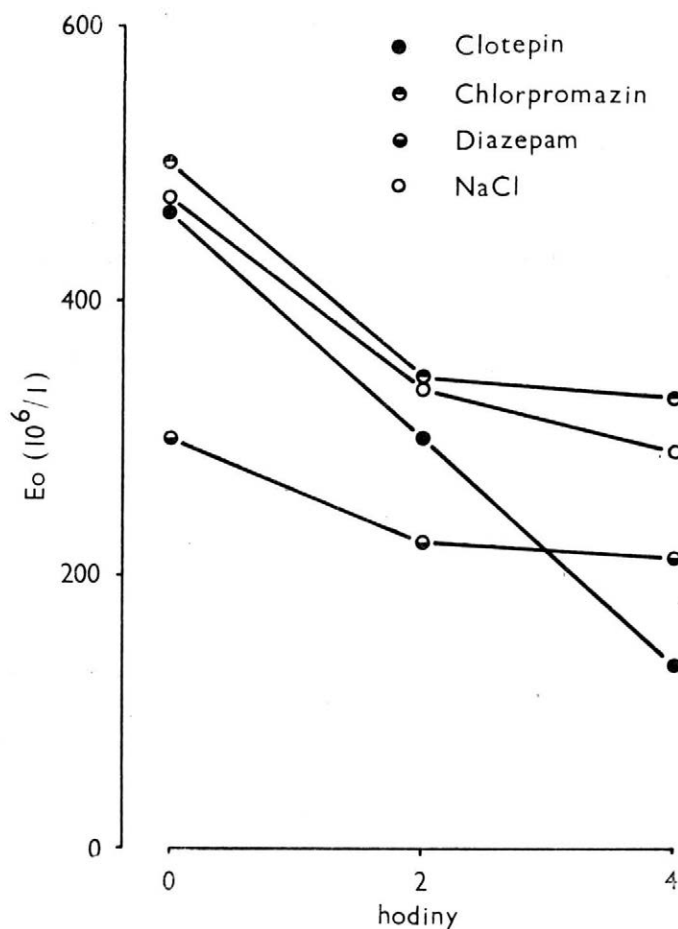
ních granulocytů (Eo) za dvě a čtyři hodiny po i. m. aplikaci

Počet selat	Změny Eo za dvě hodiny		Změny Eo za čtyři hodiny	
	%	průkaznost	%	průkaznost
7	-88	<0,01	- 76	<0,01
8	-74	<0,01	- 80	<0,01
6	-47	<0,05	- 6	NP
6	-37	NP	- 6	NP
6	-77	<0,01	- 73	<0,01
7	-82	<0,01	- 89	<0,01
13	-47	<0,01	- 44	<0,05
9	-89	<0,01	- 83	<0,01
9	-79	<0,01	- 81	<0,01
7	-36	NP	- 71	<0,01
7	-25	NP	- 29	NP
7	-32	NP	- 34	NP
7	-28	NP	- 39	<0,05
3	-70		- 52	
3	+34		+100	
3	-42		+ 6	
3	-35		+ 7	

povalo a odeznělo poměrně brzy, takže již druhou hodinu po aplikaci bylo ve srovnání s kontrolními zvířaty málo znatelné.

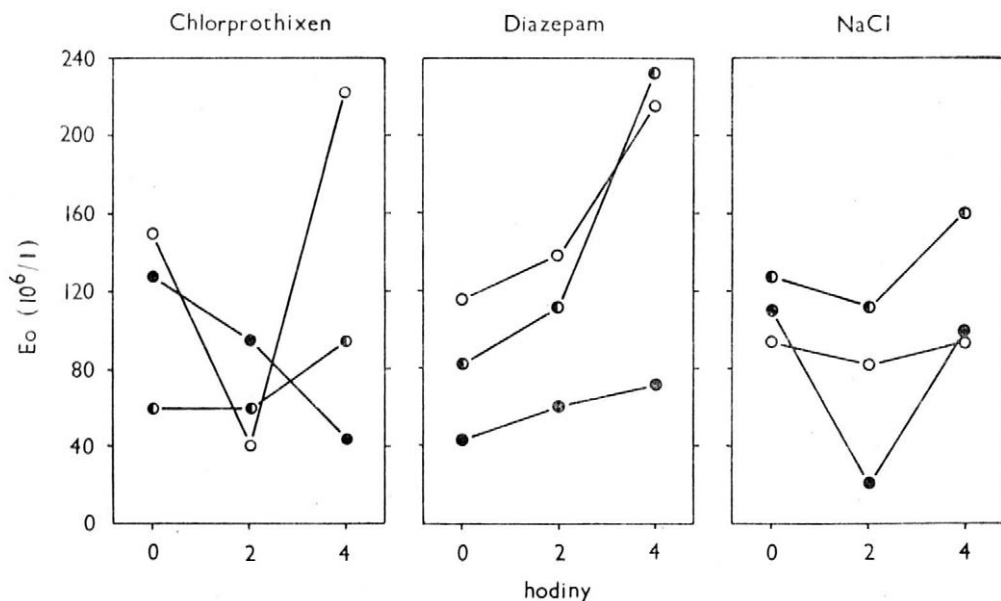
Ve třetí skupině zvířat byl testován účinek Clotepinu v dávce $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$, diazepam v téže dávce a chlorpromazinu v dávce 1 mg kg^{-1} . Byl sledován pouze počet E_o , který byl nejvíce změněn po aplikaci Clotepinu, méně po fyziologickém roztoku a nejméně po chlorpromazinu a diazepam (obr. 1 a tab. II). Redukce E_o byla největší až čtvrtou hodinu. Statistické významnosti dosáhla jen u selat ošetřených Clotepinem a fyziologickým roztokem. Sedativní účinek byl zřetelný druhou a čtvrtou hodinu po aplikaci Clotepinu a diazepam, menší, netrvající tak dlouho, byl po chlorpromazinu. Selata se dala snadněji uchopovat a při manipulaci s nimi se chovala klidněji než kontroly. Při volném pohybu v kotelci však mezi nimi nebyl výrazný rozdíl.

Ke zjištění průkaznosti rozdílů ve stupni eosinopenie mezi selaty po kontrolním ošetření fyziologickým roztokem a ošetřením použitými psychofarmaky byly testovány rozdíly v procentuálních změnách za dvě a čtyři hodiny ve srovnání se 100 procenty výchozího počtu eosinofilních granulocytů. U první skupiny byla jejich redukce průkazně větší ($P < 0,01$ nebo $0,05$) než u kontrol po aplikaci Stresnilu, Clotepinu a Clotepinu



1. Průměrné redukce počtu eosinofilních granulocytů periferní krve po intramuskulární aplikaci Clotepinu ($0,15 \text{ mg kg}^{-1}$), chlorpromazinu (1 mg kg^{-1}), diazepam ($0,15 \text{ mg kg}^{-1}$) a kontrolního fyziologického roztoku

s fenobarbitalem. Průkazně menší ($P < 0,05$) byla čtvrtou hodinu po injekci fenobarbitalu v obou použitých dávkách. U druhé skupiny nebyl mezi Chlorprothixenem a kontrolami průkazný rozdíl. Ve třetí skupině byla průkazně větší ($P < 0,05$) eosinopenie zjištěná čtvrtou hodinu po aplikaci Clotepinu.



2. Odpověď eosinofilních granulocytů periferní krve na *i. m.* injekci chlorprothixenu ($2,5 \text{ mg kg}^{-1}$), diazepamu ($0,25 \text{ mg kg}^{-1}$) a fyziologického roztoku střídavě třem selatům (stejná značka udává vždy totéž sele)

Poměrně malé průměrné snížení Eo při značných individuálních rozdílech u selat ošetřovaných diazepamem v dávce $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ dalo podnět k jeho dalšímu sledování ve čtvrté skupině zvířat. V dávce $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, která vyvolala ještě mírné krátkodobé zklidnění, byla zaznamenána výrazná redukce Eo o 70 % výchozí hodnoty (tab. II). Při dávce $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ však ke snížení Eo vůbec nedošlo. Výsledky získané u tří selat, kterým byl střídavě ve třech sledováních každému injikován diazepam ($0,25 \text{ mg kg}^{-1}$), chlorprothixen (25 mg kg^{-1}) nebo fyziologický roztok, ukazují odlišné působení diazepam u hladinu Eo periferní krve (obr. 2, tab. II). Přitom sedativní účinek byl velmi dobrý, srovnatelný s kombinovanou aplikací Clotepinu s fenobarbitalem. Chlorprothixen v použité vyšší dávce také vyvolal velmi dobré zklidnění, které však čtvrtou hodinu již nebylo patrné.

DISKUSE

Hodnocení dosažených výsledků je založeno na skutečnosti, že manipulace se zvířaty, spojená s injekčním ošetřením fyziologickým roztokem, vyvolává hematologické změny charakteristické pro zvýšenou adrenokor-

tikální funkci. Při zachování týchž pokusných podmínek, ale při použití jiných látek než fyziologického roztoku, lze testovat jejich tlumící nebo stimulující účinek na osu hypotalamus-hypofýza-kůra nadledvin, který se při její předpokládané integritě projeví prostřednictvím snížené nebo zvýšené sekrece glukokortikoidů změnami v bílém krevním obrazu.

Aplikace adrenokortikotropního hormonu (ACTH) odstaveným selatům působí neprůkazné zvýšení počtu BK, redukci Eo až k nulovým hodnotám a průkaznou lymfopenii (Dvořák, 1972). Při testaci použitých psychofarmak k tak výrazným změnám v žádném případě nedošlo. Celkový počet BK se nezvyšoval, ale snižoval po aplikaci Stresnilu, Clotepinu a Chlorprothixenu výrazněji než tomu bylo u kontrolních selat. Lze to považovat za specifický příznak použitých látek, nesouvisející s nespecifickou adrenokortikální odezvou. Pro tu nejsou u selat asi charakteristické změny počtu BK, neboť i při traumatickém stresu byl zjišťován jejich mírný pokles (Dvořák, 1968), podobně jako tomu bylo u kontrol této studie. Pokles počtu BK do jisté míry ovlivnil také absolutní počet Ly a Eo. Jejich redukce, zejména Eo, byla však podstatně většího stupně než činil úbytek BK. Při hodnocení stressové hematologické odpovědi byla menší pozornost věnována neutrofilii, kterou lze považovat za méně konstantní, popřípadě za nespecifickou vzhledem k poznatkům získaným u adrenalektomovaných selat (Dvořák aj., 1967). Zhodnocením dosažených výsledků lze některá psychofarmaka považovat za látky, jejichž jednorázové použití stimuluje kůru nadledvin ke zvýšené sekreci. Jsou to Stresnil, Clotepin a pravděpodobně v menší míře také Chlorprothixen.

Opačný účinek měl fenobarbital. Ve srovnání s kontrolními selaty neprohluboval hematologické změny, ale naopak je mírnil. Hladina Eo, která je nejcitlivějším indikátorem krátkodobých změn koncentrace glukokortikoidů v krvi, se čtvrtou hodinou po injekci fenobarbitalu vrátila k výchozí hodnotě. Hematologické účinky této látky jsou zcela v souladu se snížením koncentrace 11-hydroxykortikosteroidů v krevní plazmě po perorální aplikaci fenobarbitalu, jak zjistili u selat Raszyk a Dvořák (1975). Ti také vysvětlují na základě literárních údajů mechanismy jeho působení buď primární cestou na úrovni hypotalamu, nebo zvýšenou degradací kortikosteroidů po indukci jaterních mikrosomálních enzymů.

Indiferentní působení na bílý krevní obraz jevil chlorpromazin. Tomuto neuroleptiku byla z hlediska jeho působení na endokrinní žlázy věnována značná pozornost. Vzdor tomu však jeho vliv na systém hypofýza-kůra nadledvin není jasný. Byla pozorována inhibice uvolňování ACTH při stresu i uvolňování ACTH samotným chlorpromazinem. Zpravidla při vyšších dávkách zvyšuje adrenokortikální aktivitu. Nejeví inhibiční účinek při odpovědi kůry na podání ACTH (Christy aj., 1957; Betz a Ganoug, 1963; de Wied, 1967; Soulaire aj., 1972).

Odlišné hematologické účinky v závislosti na dávkování měl diazepam. Při nízkých dávkách s menším sedativním působením jevil tendenci ke stimulaci, při množství vyvolávajícím čtyřhodinové dobré zklidnění k tlumení adrenokortikální funkce. Tyto poznatky by ovšem bylo třeba u prasat dále ověřit. U telat působí diazepam v dávce $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ při transportu zvýšení hladiny 11-hydroxykortikosteroidů, ačkoliv snižuje ztráty na tělesné hmotnosti (Völker aj., 1974). U lidí – chronických

alkoholiků — neovlivňuje koncentraci plazmatického kortisolu, avšak u těchto osob je funkce osy hypotalamus — hypofýza — kůra nadledvin narušena (Merry a Marks, 1972), takže nelze z těchto údajů dělat spolehlivé závěry.

Tato studie poskytuje také poznatky o srovnatelném účinku použitých psychofarmak. Za vhodné sedativum pro prasata je považován Stresnil, určený k parenterálnímu ošetření. K přehánění zvířat je udávána jako postačující dávka $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$, dávka 2 mg kg^{-1} působí dokonalou neurolepsií s přechodným ulehnutím (Symoens, 1970, Jones, 1972, Schlecht a Pfund, 1972). Lze tedy použitou dávku 1 mg kg^{-1} považovat za střední. Vzhledem k výrobcem doporučenému dávkování pro lidi, popřípadě pro zvířata, lze u dalších použitých farmak pokládat za střední intramuskulární dávku 2 mg kg^{-1} u fenobarbitalu, 1 mg kg^{-1} u chlorprothixenu, 1 mg kg^{-1} u chlorpromazinu a $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ u diazepam. U Clotepinu se zřetelem k jeho farmakologickým vlastnostem (Metyš aj., 1971) a k doporučenému orálnímu dávkování se od střední dóze asi příliš neodchyluje $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$. V těchto dávkách působil Stresnil nejvýraznější sedaci pro svůj rychle nastupující poměrně krátkodobý účinek. Vzhledem k delšímu, třebaž méně nápadnému působení, se jeví jako spolehlivý diazepam i Clotepin. U ostatních by asi bylo pro odstavená selata žádoucí vyšší dávkování než bylo použito. Získané výsledky upozorňují na to, že někdy jsou k ošetření zvířat při stresu doporučována farmaka, která sama mohou být označena jako stressory. Při psychickém vzrušení zvířat tlumí sice specifické viditelné příznaky tohoto stresu, ne však jeho nespecificky zvýšenou adrenokortikální aktivitu, kterou naopak mohou zvyšovat.

Literatura

- AUŠKOVÁ, M.: Trankvilizační látky v živočišné výrobě a ve veterinárním použití. Biologizace Chem. Výž. Zvř., 2, 1966, s. 94-96.
- AUŠKOVÁ, M. — KARLOVÁ, M. — KOZEL, V.: Význam ataraktik pro hospodářská zvířata a pro drůbež. Agrochémia, 11, 1971, s. 285-287.
- BETZ, D. — GANOUG, W. F.: Effect of chlorpromazine on pituitary — adrenal function in the dog. Acta endocr., Copenh., 43, 1963, s. 264-270.
- BORRELL, J. — LLORENS, I. — BORRELL, S.: Study of the effects of morphine on adrenal corticosteroids, ascorbic acid and catecholamines in unanaesthetized and anaesthetized cats. Horm. metab. Res., 5, 1974, s. 351-358.
- BROŽ, J.: Možnosti použití trankvilizačních látek ve výkrmu hospodářských zvířat. Biologizace Chem. Výž. Zvř., 10, 1974, s. 365-368.
- DVOŘÁK, M.: Hodnocení funkčního stavu kůry nadledvin u anemických selat Thornovým testem. Vet. Med. (Praha) 9, 1964, č. 3, s. 173-184.
- DVOŘÁK, M.: The effect of traumatic stress on the leucocyte blood picture in the course of the postnatal development of piglets. Acta Univ. Agric., Fac. vet. (Brno), 37, 1968, s. 537-544.
- DVOŘÁK, M.: Hematologické příznaky stresu při odstavení selat. Vet. Med. (Praha), 17, 1972, č. 2, s. 81-90.
- DVOŘÁK, M. — GILKA, F. — VĚŽNÍK, Z.: Adrenalectomy in piglets. I. Clinical, hematological and pathomorphological studies. Docum. vet., (Brno), 6, 1967, s. 229-240.
- HILLS, A. G. — FORSHAM, P. H. — FINCH, C. A.: Changes in circulating leucocytes induced by the administration of pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in man. Blood, 3, 1948, s. 755-768.

- CHRISTY, N. P. — LONGSON, D. — HORWITZ, W. A. — KNIGHT, M. M.: Inhibitory effect of chlorpromazine upon the adrenal cortical response to insulin hypoglycemia in man. *J. clin. Invest.*, 36, 1957, s. 543-549.
- JONES, R. S.: A review of tranquillisation and sedation in large animals. *Vet. Rec.*, 90, 1972, s. 613-617.
- MARTÍNEK, B.: Veterinární perorální psychofarmaka. [Stud. zpráva.] VÚFB, Praha 1968.
- MERRY, J. — MARKS, V.: The effect of alcohol, barbiturate, and diazepam on hypothalamic (pituitary) adrenal function in chronic alcoholics. *Lancet*, II, 1972, s. 990-991.
- METÝŠ, J. — METÝŠOVÁ, J. — VOTAVA, Z. — BENEŠOVÁ, O. — DLABAČ, A. — KAZDOVÁ, E. — FRANC, Z. — QUEISNEROVÁ, M. — KRAUS, P. — VANĚČEK, M. — HRADIL, F. — JÍLEK, J. O. — PROTIVA, M.: Farmakologické vlastnosti neuroleptika oktoklolepinu. *Farmakoterap. Zprávy Spofa*, 17, 1971, s. 131-159.
- PIRALIŠVILI, I. S.: K metodice podčeta eozinofilů v periferní krvi. *Lab. Delo*, 8, 1962, č. 2, s. 20-22.
- RASZYK, J.: Vliv zvýšené adrenokortikální sekrece na hladinu glukózy v krvi selat. *Vet. Med. (Praha)*, 19, 1974, č. 10, s. 601-607.
- RASZYK, J. — DVOŘÁK, M.: Selyeho pojetí stressu, adaptačních mechanismů a rezistence. *Veterinářství*, 24, 1974, s. 436-437.
- RASZYK, J. — DVOŘÁK, M.: Účinek glukózy a fenobarbitalu na koncentraci 11-hydroxykortikosteroidů v krevní plazmě selat. *Vet. Med. (Praha)*, 21, 1976, č. 2, v tisku.
- SELYE, H.: The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. clin. Endocr. Metab.*, 6, 1946, s. 117-230.
- SCHLECHT, H. — PFUND, L.: Über die praktische Anwendung von Stresnil beim Schwein während der Mast und bei Transporten. *Wien. tierärztl. Mschr.*, 59, 1972, s. 76-80.
- SOULAIRAC, A. — SCHAUB, C. — FRANCHIMONT, P. — PAJOT, M. Th.: Influence des neuroleptiques sur la fonction hypothalamo-hypophyso-corticotrope et sur la fonction hypothalamo-somatotrope. *Annls. Endocr.*, 33, 1972, s. 340-343.
- SYMOENS, J. von: Vorbeugen und Heilung von Aggressivität und Stress bei Schweinen durch das Neuroleptikum Azaperone. *Dte tierärztl. Wschr.*, 77, 1970, s. 144-148.
- THORN, G. W. — FORSHAM, P. H. — PRUNTY, F. T. G. — HILLS, A. G.: A test for adrenal cortical insufficiency. *J. Am. med. Ass.*, 137, 1948, s. 1005-1009.
- VÖLKER, H. — HÖLZEL, W. — GRÄTSCH, U.: Indikation von Psychopharmaka bei Tiertransporte. *Mh. VetMed.*, 29, 1974, s. 177-181.
- WIED, D. de: Chlorpromazine and endocrine function. *Pharmac. Rev.*, 19, 1967, s. 251-288.

Došlo dne 12. 6. 1975

ДВОРЖАК М., РАШИК Й. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Воздействие некоторых психофармаков на гематологическую стрессовую реакцию у поросят. *Vet. Med. (Praha)* 20 (10-11): 689-699, 1975.

У 4 групп поросят-отъемышей в течение 4 час. изучали седативное и стрессовое действие 6 психофармаков внутримышечного введения и сравнивали с контрольным введением физиологического раствора. Удовлетворительное успокоение с помощью Стренила и Клотепина сопровождалось гематологическими признаками повышенной функции надпочечной коры. Также хлорпроксен вызвал большие эозинофилию и лимфопению, чем в контроле; разница, однако, как и в случае хлорпромазина, статистически недостоверна. Доза 0,1 мг/кг диазепама проявляла тенденцию к стимуляции, а 0,25 мг — к подавлению аденокортикальной активности. Фенобарбитал в количестве 2—5 мг/кг надежно ослаблял гематологическую стрессовую реакцию на манипулировку с поросятами, но его успокаивающее действие не достигло степени других тестируемых фармаков. Согласно упоминанию, некоторые невролептики хотя и в состоянии подавлять внешние признаки взволнованности животных, но они не могут ослаблять в то же время повышенную секрецию кортикостероидов.

Стренил; Клотепин; хлорпроксен; диазепам; фенобарбитал; кора надпочечников

DVOŘÁK M., RASZYK J. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). *The Effect of Some Psycho-Drugs on the Haematological Stress Response in Piglets*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 689-699, 1975.

In four groups of weaned piglets, the authors studied four hours after intramuscular administration of psycho-drugs their sedative and stress effects, as compared with a control application of a physiological solution. Good calming effects were obtained with Stresnil and Clotepin, but haematologically their administration was accompanied by intensive action of the adrenal glands. Chlorprothixen caused greater eosinopenia and lymphopenia than in the controls; however the difference, just as in the case of chlorpromazine, was statistically insignificant. The administration of 0.1 mg/kg of diazepam tended to stimulate, while the dose of 0.25 mg/kg tended to slow down adrenocortical activity. Haematological stress response was reliably weakened by doses of 2 and 5 mg/kg of phenobarbital, whose calming effect was however not as high as with other tested drugs. The authors point out that in the case of stress situations, some neuroleptic drugs are capable of calming the external symptoms but not the higher secretion of the corticosteroids.

Stresnil; Clotepin; chlorprothixen; diazepam; phenobarbital; adrenal cortex

DVOŘÁK M., RASZYK J. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Wirkung einiger Psychopharmaka auf die hämatologische Streßreaktion bei Ferkeln*. Vet. Med. (Praha) 20 (10-11) : 689-699, 1975.

Bei vier Gruppen von abgesetzten Ferkeln wurden vier Stunden hindurch die sedativen und die Streßwirkungen von sechs intramuskulär verabreichten Psychopharmaka im Vergleich zur Kontrollapplikation einer physiologischen Lösung untersucht. Die durch Stresnil und Clotepin ausgelöste gute Beruhigung war mit hämatologischen Merkmalen einer erhöhten Funktion der Nebennierenrinde begleitet. Ähnlich verursachte des Chlorprothixen eine größere Eosinopenie und Lymphopenie als bei der Kontrolle. Der Unterschied war aber, ähnlich wie nach Chlorpromazin, statistisch unsignifikant, die Dosis von 0,1 mg je kg Diazepam zeigte eine Stimulationstendenz. Die Dosis 0,25 mg je kg führte zur Dämpfung der adrenokortikalen Aktivität. Die hämatologische Reaktion auf die angewandte Manipulation mit Ferkeln wurde verlässlich durch das Phenobarbital in Mengen von 2 und 5 mg je Kilogramm verringert. Die beruhigende Wirkung dieses Stoffes erreichte aber den bei Applikation anderer Pharmaka erzielten Beruhigungsgrad nicht. Es wird darauf hingewiesen, daß bei Erregungen der Tiere einige Neuroleptika zwar die äußeren Symptome dieses Streßzustandes, nicht aber die gleichzeitig erhöhte Sekretion der Kortikosteroide verringern können.

Stresnil; Clotepin; Chlorprothixen; Diazepam; Phenobarbital; Nebennierenrinde

Rukopis odevzdán k tisku 25. 8. 1975 – Podepsáno k tisku 27. 1. 1976

Adresa autorů:

MVDr. M. Dvořák, CSc., MVDr. J. Raszyk, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 602 32 Brno - Medlánky

Maximálně účinná terapie žaludečních, střevních
a plicních helmintóz u skotu, ovcí a koz.

NILVERM

orální nálev

Experimentální a terénní ověření v mnoha zemích
světa včetně Československa a stejně tak i
celosvětové přijetí tohoto preparátu
veterinárními lékaři a chovateli hospodářských
zvířat ukázaly, že Nilverm je vynikajícím
anthelmintikem.

Nilverm ničí široké spektrum gastrointestinálních
nematodů a hlísty druhu Dictyocaulus, přičemž
jeho účinnost proti nezralým nematodům nebyla
dosud překonána. Příznivý koeficient bezpečnosti
dovoluje i náhodné předávkování a také není
třeba činit žádná speciální opatření dávkování
preparátu nebo omezovat ostatní druhy
meditace.

Další předností je, že se Nilverm aplikuje v
jednotné dávce bez ohledu na stupeň nebo druh
invaze.

NILVERM

Orální nálev obsahuje 3% tetramisol hydro-
chloridu. Nilverm je chráněná známka.

Dodává se v balení po 1 litru. V licenci vyrábí
Bioveta Ivanovice na Hané a Bioveta Nitra.

Výhradní zastoupení a
obchodní a vědecké informace
zajišťuje v CSSR
ZENIT/INEXCO ARGOSY LTD.
Jirečkova 11
170 00 Praha 7



Imperial Chemical Industries Ltd.
Pharmaceuticals Division
Alderley Park Macclesfield
Cheshire, England

Čepica A., Menšík J., Pospíšil Z., Řezníček P.: Izolace a identifikace viru bovinní virové diarrhoey — slizniční choroby (BVD-MD) v ČR	569
Jurmanová K., Hájková M., Krejčí J., Černá J.: Účast mykoplasmat na respiračních onemocněních telat ve velkokapacitních teletnicích v ČSSR	583
Menšík J., Čepica A., Hájková M., Štěpánek J., Rozkošný V.: Průkaz protilátek proti viru infekční bovinní rhinotracheitidy (IBR) v raném a pozdním postinfekčním období	595
Menšík J., Pospíšil Z., Suchánková A., Čepica A., Rozkošný V., Šmíd B., Machatkova M.: Využití komplexní virologické techniky k přímému průkazu virů PI-3 a IBR v orgánech infikovaných telat	609
Rozkošný V., Pospíšil Z., Vrba Z.: Vliv tytanu na kultivaci buněčných a orgánových kultur derivovaných z telecích tkání	623
Salajka E., Šarmanová Z., Hornichová A.: Specifita diagnostických sér pro určování 0-antigenů <i>Escherichia coli</i> aglutinací	633
Salajka E., Šarmanová Z., Hornich M., Ulmann L.: 0-antigeny kmenů <i>Escherichia coli</i> z telat stížených průjemem v raném postnatálním období	645
Salajka E., Ulmann L., Šarmanová Z., Hornich M.: Specifická prevence a léčba diarrehoických kolinfekcí u novorozených telat	659
Valíček L., Šmíd B.: Morfogenez herpesvirů skotu	671
Šťavíková M., Ingr I., Lojda L.: Genetický podíl na složení lipidů laktoseba bovinního strukového kanálku	679
Dvořák M., Raszyk J.: Účinek některých psychofarmak na hematologickou stressovou odpověď u selat	689
Recenze	
Collák D.: Nickel R., Schummer A., Seiferle E. — Lehrbuch der Anatomie der Haustiere (Band IV). Nervensystem, Sinnenorgane, endokrine Drüsen	632

СОДЕРЖАНИЕ

Чепица А., Меньшик Я., Поспишил З., Ржезничек П.: Изоляция и идентификация вируса поноса (BVD-MD) в ЧСР	580
Юрманова К., Гайкова М., Крейчи Й., Черна Й.: Участие микоплазмы в заболевании дыхательных путей у телят в крупногабаритных телятниках в ЧССР	592
Меньшик Я., Чепица А., Гайкова М., Штепанек Я., Розкошны В.: Доказательство антител вируса IBR в раннем и позднем периоде после инфекции	607
Меньшик Я., Поспишил З., Суханкова А., Чепица А., Розкошны В., Шмид Б., Махаткова М.: Применение комплексной вирусологической техники для прямого доказательства вирусов PI-3 и IBR в органах зараженных телят	621
Розкошны В., Поспишил З., Врба З.: Влияние тилана на культивацию клеточных и органных культур, полученных из ткани телят	630
Салайка Е., Шарманова З., Горнихова А.: Специфичность диагностических сывороток для определения 0-антигенов <i>E. coli</i> агглютинацией	643
Салайка Е., Шарманова З., Горних М., Улманн Л.: 0-антигены штаммов <i>E. coli</i> из телят, больных поносом в раннем постнатальном периоде	657
Салайка Е., Улманн Л., Шарманова З., Горних М.: Специфическая профилактика и лечение поносных коли-инфекций у новорожденных телят	669
Валичек Л., Шмид Б.: Морфогенез герпесвирусов крупного рогатого скота	676
Штавикова М., Ингр И., Лойда Л.: Участие генотипа в составе липидов лактосеба в сосковом канале	686
Дворжак М., Рашик Й.: Воздействие некоторых психофармаков на гематологическую stressовую реакцию у поросят	698

CONTENT

Čepica A., Menšík J., Pospíšil Z., Řezníček P.: The Isolation and Identification of the Virus of Bovine Virus Diarrhoea-Mucosal Disease (BVD-MD) in the Czech Socialist Republic	580
Jurmanová K., Hájková M., Krejčí J., Černá J.: The participation of Mycoplasma in the Respiratory Diseases of Calves in Large-Capacity Calf-Houses in the Czechoslovak Socialist Republic	592
Menšík J., Čepica A., Hájková M., Štěpánek J., Rozkošný V.: The Demonstration of the Antibodies against the IBR Virus during the Early and Late Post-Incubation Period	608
Menšík J., Pospíšil Z., Suchánková A., Čepica A., Rozkošný V., Šmíd B., Machatková M.: The Use of Complex Virological Technique for a Direct Demonstration of the PI-3 and IBR Viruses in the Organs of Infected Calves	621
Rozkošný V., Pospíšil Z., Vrba Z.: The Effect of Tylan on the Cultivation of Cellular and Organ Cultures Derived from Calf Tissues	631
Salajka E., Šarmanová Z., Hornichová A.: The Specificity of the Diagnostic Serums for the Agglutination Determination of <i>E. coli</i> 0-Antigens	643
Salajka E., Šarmanová Z., Hornich M., Ulmann L.: 0-Antigens of <i>E. coli</i> Strains from Calves Suffering from Diarrhoea in the Early Post-Natal Period	657
Salajka E., Ulmann L., Šarmanová Z., Hornich M.: Specific Prevention and Treatment of Diarrhoeic <i>Escherichia coli</i> -Infections in New-Born Calves	669
Valíček L., Šmíd B.: Morphogenesis of Herpesviruses in Cattle	676
Šťavíková M., Ingr I., Lojda L.: The Genetic Shore in the Composition of the Lactosebum Lipids of the Bovine Teat Canal	687
Dvořák M., Raszyk J.: The Effect of Some Psycho-Drugs on the Haematological Stress Response in Piglets	699

INHALT

Čepica A., Menšík J., Pospíšil Z., Řezníček P.: Isolierung und Identifizierung des Virus der bovinen Virus-Diarrhoeosis-Schleimhautkrankheit (BVD-MD) in der ČSR	581
Jurmanová K., Hájková M., Krejčí J., Černá J.: Anteil der Mykoplasmen an Respirationskrankheiten von Kälbern in Großkapazitätskälberställen in der ČSSR	592
Menšík J., Čepica A., Hájková M., Štěpánek J., Rozkošný V.: Nachweis von IBR-Virus-Antikörpern in der frühen und späten Postinfektionsperiode	608
Menšík J., Pospíšil Z., Suchánková A., Čepica A., Rozkošný V., Šmíd B., Machatková M.: Ausnutzung der komplexen virologischen Technik zum direkten Nachweis der PI-3- und IBR-Viren in Organen infizierter Kälber	622
Rozkošný V., Pospíšil Z., Vrba Z.: Einfluß des Tylans auf die Kultivierung der aus Kalbsgeweben derivierten Zell- und Organkulturen	631
Salajka E., Šarmanová Z., Hornichová A.: Spezifität der diagnostischen Seren zur Bestimmung der <i>E. coli</i> 0-Antigene durch Agglutination	644
Salajka E., Šarmanová Z., Hornich M., Ulmann L.: 0-Antigene von <i>E. coli</i> -Stämmen von mit Durchfall in der frühen postnatalen Periode betroffenen Kälbern	658
Salajka E., Ulmann L., Šarmanová Z., Hornich M.: Spezifische Prävenz und Therapie von diarrhoeischen Coliinfektionen bei neugeborenen Kälbern	669
Valíček L., Šmíd B.: Morphogenese der Herpesviren beim Rind	677
Šťavíková M., Ingr I., Lojda L.: Genetischer Anteil an der Zusammensetzung der Lipide des Laktosebums des bovinen Zitzenkanälchens	687
Dvořák M., Raszyk J.: Wirkung einiger Psychopharmaka auf die hämatologische Stressreaktion bei Ferkeln	699

Rozšiřuje Poštovní novinová služba. Objednávky a předplatné přijímá PNS — ústřední expedice tisku, administrace odborného tisku, Jindřišská ulice 14, 110 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.