

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

5

ROČNÍK 23 (LI)
PRAHA
KVĚTEN 1978
CENA 10 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

Řídí redakční rada:

prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc. (předseda), prof. MVDr. Koloman Boďa, DrSc., doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr. Jaroslav Dražan, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., MVDr. Miloš Halaša, CSc., doc. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., prof. MVDr. Emanuel Král, doc. MVDr. Ladislav Polák, CSc., MVDr. Josef Raszyk, CSc., MVDr. Antonín Tesař, CSc., akademik Jaroslav Vrtiak.

Za vedení časopisu odpovídá prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc.

Redaktorka ing. Jovanka Václavičková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1978

■
Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozbor a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Československá akademie zemědělská — Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství. Vychází měsíčně. Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 237541. Celoroční předplatné Kčs 120,—.

■
Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзоры, анализы и научные статьи о разрешенных задачах по научному исследованию в области ветеринарии. Издаёт Чехословацкая сельскохозяйственная академия — Институт научно-технической информации по сельскому хозяйству. Выход в свет ежемесячно. Редакция 120 56 Прага 2, Слезска 7.

■
The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publishes studies, analyses and scientific treatises about the solved research tasks in the line of the veterinary medicine. Published by the Czechoslovak Academy of Agriculture — Institute of Scientific and Technical Information for Agriculture. Issued monthly. Editorial office 120 56 Prague 2, Slezská 7.

■
Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍNA veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Abhandlungen über die gelösten Forschungsaufgaben auf dem Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben von der Tschechoslowakischen landwirtschaftlichen Akademie — Institut für wissenschaftlich-technische Information der Landwirtschaft. Erscheint monatlich. Redaktion 120 56 Prag 2, Slezská 7.

V. Chloupková, M. Pavlasová, I. Ingr, J. Rejholec

CHLOUPKOVÁ, V. — PAVLASOVÁ, M. — INGR, I. — REJHOLEC, J. (Vysoká škola veterinární, Brno; Ústředí veterinárních asanačních ústavů, Praha; Vysoká škola zemědělská, Brno; Státní veterinární ústav, Terežín): *Vliv diet s přísadky kafilerních tuků na mléčnou užitkovost a na obsah vitamínu E v mléce dojníc*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 257-266.

Na třech skupinách prvotek po 15 kusech po dobu šesti měsíců při shodné základní dietě jsme sledovali vliv přísadky směsi DOB bez tuku, směsi DOB s 5% obsahem kafilerního tuku mechanicky získaného a DOB s 5% kafilerního tuku z perchlóretylénové extrakce (0,90 % reziduí perchlóretylénu). Tento přírůvek kafilerních tuků do jaderných směsí náhradou za obiloviny v našem pokusu zvýšil mléčnou užitkovost a produkci mléčného tuku při současné úspoře jaderných krmiv. Přírůvek kafilerních tuků, u nichž jsme se setkávali s nižší kvalitou, vedl k poklesu obsahu vitamínu E jak v krevním séru, tak i v mléce. náhrada obilovin; perchlóretylénová extrakce; TBA-test; číslo kyselosti tuku; FCM

Využití různých druhů tuků při výrobě krmných směsí pro jednotlivé druhy hospodářských zvířat se stalo v mnoha státech s vysokou úrovní zemědělské výroby běžnou záležitostí. Tuky jsou i v našem krmivářském průmyslu již několik roků zařazovány při výrobě tukovaných krmných směsí (např. pro drůbež a pro skot); konkrétně pro vysokoprodukční dojnice se podle „Receptur krmných směsí“ vyrábí směs DOMT s přísadkou 5 % tuku. Tento přírůvek tuku je především posuzován jako zdroj zvýšení energie v krmných dávkách dojníc, jako vhodný způsob, jak využít odpady potravinářského průmyslu a výrobky veterinárních asanačních ústavů a konečně v současné době je nutné využívání tuků posuzovat i z hlediska možné náhrady jaderného podílu krmné dávky dojníc.

Využíváním živočišných tuků v krmných dávkách dojníc a ověřováním jejich působení na množství produkovaného mléka a kvantitativní a kvalitativní parametry mléčného tuku se zabývá mnoho našich i zahraničních výzkumných publikací.

Série pokusů se zkrmováním tuku u dojníc byla realizována v Dánsku. Larsen aj. (1969) shrnují poznatky konstatováním, že na zvýšení dojivosti o 0,5 až 0,9 kg FCM příznivě působí přísadky 20 až 30 g stravitelného tuku na 1 kg FCM. Dokazují rovněž, že kvalita mléka a másla se při zkrmování tuku nezhoršuje, ale

naopak, obsahoval-li podávaný tuk méně než 5 % volných mastných kyselin a bylo-li peroxidové číslo nižší než 4, prodloužila se skladovatelnost másla.

Storry aj. (1974) prokázali, že u dojníc, u kterých se obsah mléčného tuku snižuje (na 2 %) tím, že se podávají krmné dávky s nízkým obsahem vlákniny, lze přidavkem loje do krmných dávek dosáhnout zvýšení produkce tohoto tuku na normální hranici.

Pajtáš aj. (1973) považují za optimální přídavek živočišného tuku pro dojnice 5 %. V pokusech prokázali nižší spotřebu krmných směsí na 1 kg nadojeného mléka o 5,32 %, při přepočtu na FCM o 8,42 %. Pozitivně bylo také ovlivněno množství nadojeného mléka; při přepočtu na FCM to představovalo zvýšení o 6,75 %, produkce mléčného tuku byla zvýšena o 9,87 %. Upozorňují také na závažnou skutečnost, že totiž dávky tuku do krmných směsí pro dojnice, vyšší než 5 %, jsou neefektivní nejen z hlediska užítkovosti, ale i z hlediska ekonomického. Při přepočtu na velkoobchodní ceny tukového průmyslu v jejich pokusech použitý zdroj tuků, tj. hovězí lůj (1050 Kčs q⁻¹) a vepřové sádlo II. jakost (1800 Kčs q⁻¹), se stal i přes uvedené příznivé výsledky ekonomicky neefektivní. Autoři v závěrech konstatují, že podle jejich výsledků a přepočtů by cena živočišných tuků neměla překročit hranici 700 Kčs q⁻¹. Z ekonomického hlediska se tedy jako výhodný zdroj jeví kafilerní tuk, jehož cena se pohybuje kolem 400 Kčs q⁻¹. Kafilerní tuk je výrobkem VAÚ a získává se jednak mechanicky na lisech nebo odstředivkách, jednak extračně pomocí benzínu nebo perchlóretylénu. Poslední jmenovaný technologický způsob získávání kafilerního tuku se podílí na celkovém objemu výroby přibližně 15 %. Vzhledem ke skutečnosti, že jsme se nesetkali s publikovanými experimentálními pracemi, které by se zabývaly vlivem kafilerního tuku z perchlóretylenové extrakce na zdravotní stav dojníc, produkci mléka, mléčného tuku a jeho kvalitativní ukazatele, zaměřili jsme se v této etapě svých pokusů právě na ověřování této problematiky.

MATERIÁL A METODY

V provozních podmínkách na státním statku Dubá byl po dobu šesti měsíců ověřován vliv přídávku 5 % kafilerních tuků k doplňkové směsi DOB pro dojnice; byla jí nahrazena část obilovin ve směsi. Ověřovali jsme tři skupiny prvotetek po 15 zvířatech ve stejném stadiu laktace. Základ krmné dávky byl shodný pro všechny tři skupiny: denně jsme podávali 27 kg kukuřičné siláže, 2 kg senné moučky, 4 kg krmné směsi DOB a 0,2 kg vitapolymínu. Kontrolní skupina dostávala směs DOB bez přídávku tuku, první pokusná skupina směs DOB s přídávkem 5 % kafilerního tuku získaného mechanickou cestou a druhá pokusná skupina s přídávkem 5 % kafilerního tuku z perchlóretylenové extrakce. Průměrný obsah živin v krmných dávkách jednotlivých skupin pokusných zvířat, stanovený analýzou krmiv podle ČSN 46 7007, byl:

	sušina (kg)	SNL (g)	ŠJ
první pokusná skupina	12,29	1161	7,5
druhá pokusná skupina	12,27	1180	7,5
kontrolní skupina	12,26	1197	7,2

Krmná směs DOB se po celých šest měsíců pokusu vyráběla ve Výrobně krmných směsí V. Grunov tak, aby skladování netrvalo déle než tři měsíce. Pro první výrobní šarži, tj. na začátku pokusu (únor), byla směs doplněna kafilerními tuky, jejichž jakost (stanovená podle ČSN 58 0101) byla charakterizována těmito údaji:

	kafilerní tuk extrahovaný per- chlóretylenem	kafilerní tuk odstředivkový
číslo kyselosti tuku	35,06	50,45
peroxidové číslo	0,00	2,30
jódové číslo (podle Hanuše)	52,68	49,10
TBA-test	8,10	0,82

U druhé výrobní šarže směsi DOB (květen) byly hodnoty použitých kafilerních tuků:

	kafilerní tuk extrahovaný per- chlóretylénem	kafilerní tuk odstředivkový
číslo kyselosti tuku	23,09	40,16
peroxidové číslo	8,48	4,55
jódové číslo (podle Hanuše)	54,63	50,10
TBA-test	1,32	0,45

V pravidelných měsíčních intervalech byly u všech tří skupin dojníc odebírány vzorky mléka při večerním a ranním dojení pro stanovení obsahu tokoferolu (podle ČSN 56 0055) a zároveň se hodnotila produkce mléka a mléčného tuku (kontrola užítkovosti). Produkce mléka a mléčného tuku byly propočtem převedeny na FCM (mléko se 4% obsahem tuku). Ve stejných intervalech byla u dojníc odebírána krev ke stanovení hladin vitamínu E v krevním séru podle Emmerieho (Knobloch, 1956). Dosažené výsledky byly vyjádřeny průměrnými hodnotami ($\bar{x}$) a byla hodnocena jejich variabilita (s_r = relativní směrodatná odchylka). Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny statisticky t-testem. Pro názornost byly výsledky graficky znázorněny pomocí indexu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Zařazení tuků do krmných dávek pro dojnice se kladně projevilo na mléčné produkci (tab. I). U skupiny s přídatkem odstředivového tuku se dokonce bezprostředně po zařazení diety zvýšila produkce mléka proti období před pokusem. Mezi jednotlivými skupinami však nebyly zaznamenány průkazné rozdíly ($P > 0,05$). Produkci mléka u jednotlivých skupin v pokusném období ve srovnání s obdobím před poku-

I. Produkce mléka v kg — Milk production in kg

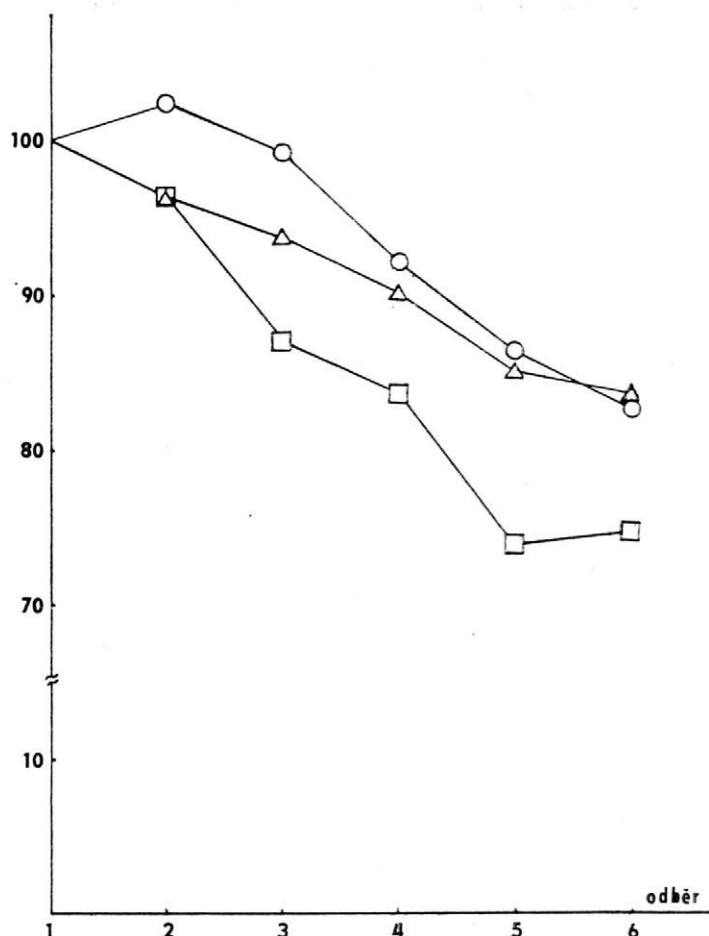
Období	Pokusná skupina I		Pokusná skupina II		Kontrolní skupina	
	$\bar{x}$	s_r	$\bar{x}$	s_r	$\bar{x}$	s_r
Únor ⁺	15,41	14,32	15,49	11,75	16,09	16,29
Březen	15,78	16,49	14,93	17,67	15,51	15,28
Duben	15,29	19,57	14,52	21,08	14,00	13,52
Květen	14,21	21,39	13,97	17,88	13,47	15,66
Červen	13,33	19,36	13,19	18,67	11,92	17,94
Červenec	12,76	18,64	12,97	20,66	12,04	15,54

⁺ předpokusné období

sem zachycuje obr. 1. Po celých šest měsíců pokusného období byl pokles mléčné užítkovosti u pokusných skupin menší než u skupiny kontrolní. U skupiny s odstředivovým tukem představoval 17,20 %, u skupiny s extrahovaným tukem 16,27 % a u kontrolní skupiny 25,17 %.

Vysvětlivky k obr. 1 až 4:

- skupina pokusná I
△ skupina pokusná II
□ skupina kontrolní



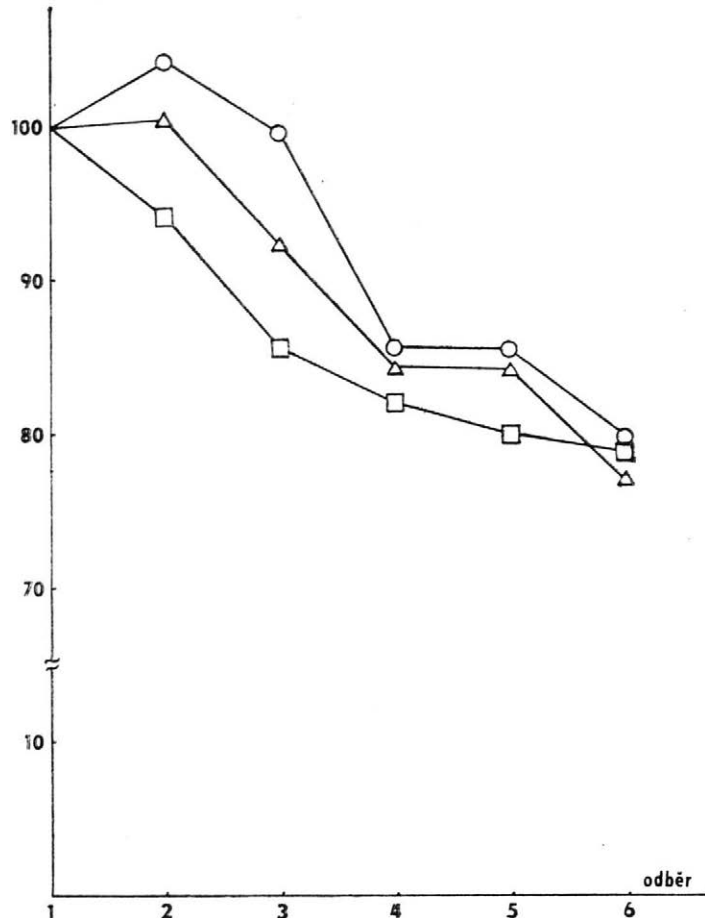
II. Produkce mléčného tuku v kg — Milk fat production in kg

Období	Pokusná skupina I		Pokusná skupina II		Kontrolní skupina	
	$\bar{x}$	s_r	$\bar{x}$	s_r	$\bar{x}$	s_r
Únor ⁺	0,674	13,62	0,665	17,22	0,666	22,63
Březen	0,696	13,95	0,669	21,00	0,628	29,51
Duben	0,664	16,81	0,610	16,79	0,571	14,45
Květen	0,577	23,62	0,562	18,18	0,546	15,55
Červen	0,576	16,04	0,559	16,83	0,532	13,16
Červenec	0,538	17,23	0,512	18,71	0,525	17,54

⁺ předpokusné období

Produkce mléčného tuku [tab. II] byla zařazením tuků do diety kladně ovlivněna. Nejvýrazněji se vliv tuku na produkci mléčného tuku projevil v prvním měsíci po zařazení pokusných diet, kdy se u obou pokusných skupin přechodně zvýšily jeho produkce proti období před

2. Produkce FCM vy-
jádřená indexem — FCM
production — index
description



III. Produkce FCM v kg — FCM production in kg

Období	Pokusná skupina I		Pokusná skupina II		Kontrolní skupina	
	$\bar{x}$	s_r	$\bar{x}$	s_r	$\bar{x}$	s_r
Únor ⁺	16,85	13,61	16,63	17,31	16,66	22,57
Březen	17,55	14,85	16,71	20,98	15,69	12,79
Duben	16,60	16,82	15,35	18,17	14,27	14,42
Květen	14,43	23,55	14,03	18,23	13,66	15,60
Červen	14,39	16,07	13,99	16,73	13,30	13,19
Červenec	13,43	17,17	12,81	18,57	13,11	17,61

⁺ předpokusné období

pokusem. Ve třetím měsíci byla produkce mléčného tuku u pokusné skupiny I významně vyšší ($P < 0,05$) než u skupiny kontrolní.

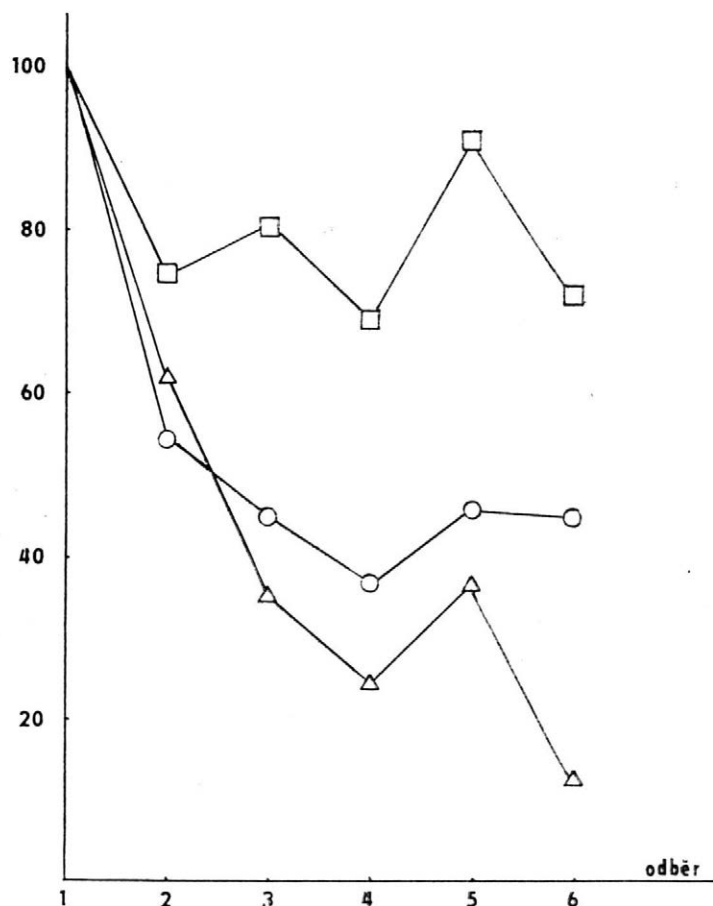
Nejlépe můžeme hodnotit produkci mléka a mléčného tuku při přepočtu na FCM (obr. 2, tab. III). Nejvyšší produkci FCM jsme zázna-

menali u skupiny s přídavkem odstředivkového tuku, kde se ve druhém a třetím měsíci produkce významně zvýšila ($P < 0,05$) ve srovnání se skupinou kontrolní. Za celé pokusné období připadala na jednu dojnici v průměru tato produkce FCM:

první pokusná skupina	2337,84 kg
druhá pokusná skupina	2230,53 kg
kontrolní skupina	2142,82 kg

Množství vyprodukovaného FCM u skupin pokusných bylo o 9,1 a 4,1 % vyšší než u skupiny kontrolní.

V průměrných vzorcích mléka od jednotlivých skupin jsme sledovali obsah vitamínu E: tuky negativně ovlivnily jeho obsah v mléce (obr. 3, tab. IV). Během pokusného období poklesly hodnoty E vitamínu v mléce u skupiny kontrolní o 23,15 %, zatímco u první pokusné skupiny o 54,98 % a u druhé pokusné skupiny dokonce o 87,11 %. Podobný pokles hladiny vitamínu E u jednotlivých skupin pokusných zvířat jsme zaznamenali i v krevním séru, u kterého byly rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinami pokusnými vysoce průkazné ($P < 0,01$). Obsah vitamínu E v krevním séru u všech skupin během pokusného období ve



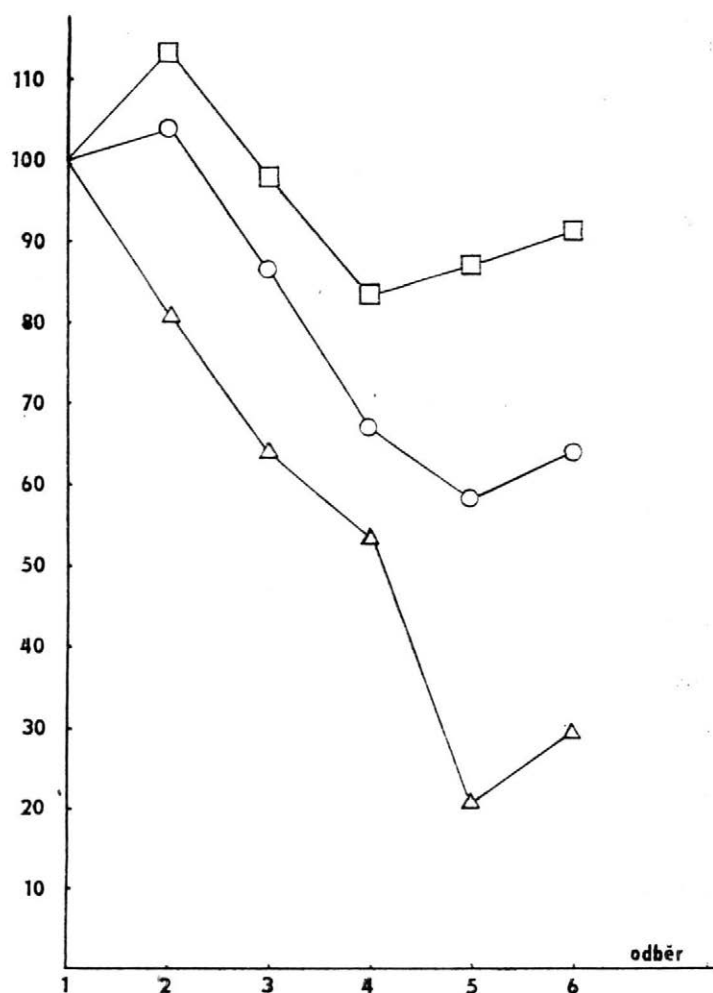
3. Obsah vitamínu E v mléce vyjádřený indexem — Vitamin E content in milk — index description

srovnáním s obdobím před pokusem poklesl (obr. 4, tab. V). Zatímco u skupiny kontrolní pokles činil 8,61 %, u první pokusné skupiny byl pokles výraznější, a to o 35,93 %, a u druhé pokusné skupiny byl nejvyšší (o 70,35 %). Z poklesu hodnot vitamínu E v mléce i v krevním

IV. Obsah vitamínu E v mléce – Vitamin E content in milk

Období	Pokusná skupina I		Pokusná skupina II		Kontrolní skupina	
	mg na 100 ml	index	mg na 100 ml	index	mg na 100 ml	index
Únor ⁺	0,145	100,00	0,116	100,00	0,119	100,00
Březen	0,079	54,29	0,072	62,28	0,088	74,37
Duben	0,065	45,02	0,041	35,31	0,096	80,67
Květen	0,053	36,77	0,028	24,40	0,082	68,99
Červen	0,067	45,84	0,043	36,94	0,108	91,09
Červenec	0,065	45,02	0,015	12,89	0,085	71,85

⁺ předpokusné období



4. Obsah vitamínu E v krevním séru vyjádřený indexem – Vitamin E content in blood serum – index description

Období	Pokusná skupina I		Pokusná skupina II		Kontrolní skupina	
	$\bar{x}$	s_r	$\bar{x}$	s_r	$\bar{x}$	s_r
Únor ⁺	1,205	26,29	1,194	26,07	1,219	23,86
Březen	1,252	27,41	0,975	43,74	1,384	29,94
Duben	1,042	36,93	0,767	37,70	1,107	22,16
Květen	0,811	11,81	0,643	21,85	1,018	24,88
Červen	0,698	38,15	0,249	84,14	1,063	27,40
Červenec	0,772	31,61	0,354	45,68	1,114	25,43

+ předpokusné období

séru je možné vyčíst závislost na kvalitě kafilerních tuků, a to především na hodnotách TBA-testu, který podle našeho názoru představuje průkaznější metodu k jejich hodnocení, než metoda kyselosti tuku uváděná v podnikové normě pro kafilerní tuk. Stejnou závislost jsme zjišťovali i v předcházejících výzkumných pracích u jiných druhů hospodářských zvířat (Chloupková aj. 1976). Nižší hladiny vitamínu E v organismu ve vztahu k vyšším hladinám peroxidů a k vyšším hodnotám TBA-testu u zkrmovaných kafilerních tuků uvádějí i Najman aj. (1974). Také Ingr aj. (1974) upozorňují na skutečnost, že při zkrmování oxidovaného sádla se u prasat snižuje koncentrace tokoferolu v játrech, zatímco při zkrmování čerstvého sádla se tyto nepříznivé důsledky neprojeví. Při zkrmování tuků, a to především tuků horší jakosti, doporučují přidávat do krmiva i potřebné množství vitamínu E.

Lze vyslovit domněnku, že snížení obsahu vitamínu E v krevním séru a v produktech by bylo možné zabránit i přidávkou antioxidantních látek do krmiv obohacovaných kafilerními tuky.

Literatura

CHLOUPKOVÁ, V. — PAVLASOVÁ, M. — INGR, I.: Sledování vlivu zkrmování kafilerních tuků u prasat na užitkovost a údržnost jatečných produktů. Zborník referátů z II. mezinárodního sympózia, St. Smokovec 1976, s. 526-536.

INGR, I. — TOULOVÁ, M. — NAJMAN, L.: Vliv oxidované tukové složky krmných směsí na údržnost depotního a svalového tuku prasat. Vet. Med., Praha 19, 1974, č. 7, s. 407-413.

KNOBLOCH, E.: Stanovení tokoferolů v krevním séru podle A. Emmerieho a Engela. Fyzikálně chemické metody stanovení vitamínu, 1956, s. 416-419.

LARSEN, B. J. — ANDERSEN, H. R. — CHRISTIANSEN, B.: Animal fat for cows in milk. Eur. Ass. anim. Prod., 15, 1969, s. 15.

NAJMAN, L. — TOULOVÁ, M. — INGR, I. — URBANOVÁ, J. — HERZIG, I.: Vliv kafilerního tuku na zdravotní stav, užitkovost, hladiny vitamínu E v orgánech a oxidativní stabilitu hřbetního tuku prasat ve výkrmu. Vet. Med., Praha, 19, 1974, č. 7, s. 415-422.

PAJTÁŠ, M. — SOMMER, A. — SÝKORA, V.: Výskum využitia tuku ako energetic-

kého zdroja v krmných dávkach dojnic vysokoužitkového typu z hľadiska ich užitočnosti. [Záverečná správa.] Nitra, Výskumný ústav živočíšnej výroby, 1973.

STORRY, J. E. — BRUMBY, P. E. — HALL, A. J. — JOHNSON, V. W.: Responses in rumen fermentation and milk-fat secretion in cows receiving low-roughage diets supplemented with protected tallow. J. Dairy Res., 1974, č. 41, s. 165-173.

ČSN 46 7007. Výživná hodnota krmiv. 1966.

ČSN 58 0101. Metody zkoušení tuků a olejů. 1965.

ČSN 56 0055. Stanovení tokoferolů v tucích a obohacených potravinách. 1973.

Došlo dne 18. 7. 1977

ХЛОУПКОВА, В. — ПАВЛАСОВА, М. — ИНГР, И. — РЕЙГОЛЕЦ, Й. (Ветеринарный институт, Брно; Центр ветеринарных ассенизационных институтов, Прага; Сельскохозяйственный институт, Брно; Государственный ветеринарный институт, Терезин): Влияние диет с добавкой кафилерных жиров на молочную продуктивность и содержание витамина Е в молоке коров. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 257-266.

На 3 группах первотелок, укомплектованных каждая из 15 животных, в течение 6 месяцев на одинаковой основной диете определяли влияние смеси ДОБ без жира, смеси ДОБ с 5 % кафилерного жира механического получения и 5 % кафилерного жира, полученного путем перхлорэтиленовой экстракции (0,90 % остатков перхлорэтилена). Эта жировая добавка взамен зерновых в концентрате увеличила в ходе наших испытаний и молочную продуктивность, и продукцию молочного жира при одновременной экономии концентратов. Добавка кафилерного жира низкого качества привела к сокращению витамина Е как в сыворотке крови, так и в молоке.

замена зерновых; перхлорэтиленовая экстракция; ТВА-тест; число кислотности жира; ФЦМ

CHLOUPKOVÁ, V. — PAVLASOVÁ, M. — INGR, I. — REJHOLEC, J. (University of Veterinary Medicine, Brno; Centre of Veterinary Sanitation Institutes, Praha; University of Agriculture, Brno; State Veterinary Institute, Terezín): *The Effect of Diets Containing Rendering-plant Fats on Milk Efficiency and on the Content of Vitamin E in the Milk of Dairy Cows*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 257-266.

In three groups of first-calvers with 15 animals each, with an identical basal diet, we followed for six months the effect of the DOB mixture additive without fat, the DOB mixture with 5 % of rendering-plant fat obtained mechanically and DOB with 5 % of rendering-plant fat after perchlorethylene extraction (0.90 % perchlorethylene residuum). This additive of rendering-plant fats in concentrate mixtures as a substitute for grain in our experiment increased milk efficiency and the production of milk fat paralleled by a saving of concentrated feeds. An addition of rendering-plant fats which were often of low quality resulted in a decrease in vitamin E content in the blood serum and milk.

substitution for cereals; perchlorethylene extraction; TBA-test; number of fat acidity; FCM

CHLOUPKOVÁ, V. — PAVLASOVÁ, M. — INGR, I. — REJHOLEC, J. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno; Zentralstelle der tierärztlichen Assanationsinstitute, Praha; Landwirtschaftliche Hochschule, Brno; Staatliches Veterinärinstitut, Terezín): *Einfluß der Diäten mit Zusatz von Abfallfett auf Milchleistung und Gehalt der Kuhmilch an Vitamin E*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 257-266.

An drei Gruppen von Erstkalbinnen je 15 Stück untersuchten wir sechs Monate lang bei der gleichen Grunddiät den Einfluß von DOB-Gemisch ohne Fett, von DOB-Gemisch mit 5 % des mechanisch gewonnenen Abfallfettes und von DOB-Gemisch mit 5 % Abfallfett aus der Perchloräthylen-Extraktion (0,90 % Residuen von Perchloräthylen). Dieser Zusatz von Abfallfett für Mischfutter als Ersatz für Getreide-

arten erhöhte in unserem Versuch die Milchleistung und die Milchfettproduktion bei der gleichzeitigen Einsparung der Kraftfuttermittel. Der Zusatz von minderwertigem Abfallfett hatte zur Folge die Herabsetzung des Gehaltes an Vitamin E sowohl im Blutserum als auch in der Milch.

Ersatz für Getreidearten; Perchloräthylen-Extraktion; TBA-Test; Fettsäurezahl; FCM

Adresa autorů:

MVDr. Věra Chloupková, MVDr. Mária Pavlasová, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

Doc. ing. Ivo Ingr, CSc., Vysoká škola zemědělská, Zemědělská 1, 603 00 Brno

MVDr. Jiří Rejholec, Státní veterinární ústav, ul. 28. října 61/63, 411 55 Terežín

J. Mazurová, E. Jiránek, P. Selinger, L. Doubravová, V. Dvořáková

MAZUROVÁ, J. — JIRÁNEK, E. — SELINGER, P. — DOUBRAVOVÁ, L. — DVOŘÁKOVÁ, V. (Státní veterinární ústav, Pardubice): *Diagnostika vibríózy u býků na plemenářských stanicích lavážemi umělé vaginy*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 267-274.

Cílem práce bylo ověřit vhodnost laváží umělých vagin používaných k odběru ejakulátů pro diagnostiku zárodku *Campylobacter fetus subsp. fetus*. Podle výsledků vyšetření se dá tato metoda považovat za rovnocennou metodě laváží prepucia. Je však třeba zdůraznit její výhody: odstraňuje nebezpečí pracovního úrazu, umožňuje kvalitní výplach v klidu v laboratoři. K záchytu zárodku *Campylobacter fetus* slouží technika filtrace přes membránové filtry při použití kultivačního media Fluid Thioglycollate medium (Difco) s přidavkem 2% agaru, 10% beraní krve a antibiotik (bacitracin, novobiocin). Procento záchytlosti činí u laváží prepucia 26,9%, u laváží umělé vaginy 26,1%. Nevýznamný rozdíl mezi chybou metodiky, za kterou je považován počet negativních nálezů pomocí jedné metodiky za současně pozitivních nálezů při použití metody druhé, činí 24,4% u laváží umělé vaginy a 22,0% u laváží prepucia.

Campylobacter fetus subsp. fetus; metoda kultivace; laváž; umělá vagina; skot

Podmínkou dobrých výsledků v inseminaci skotu je používání vysoce kvalitního a hygienicky nezávadného spermatu. Jednou z příčin zabráňujících použití spermatu k inseminaci je přítomnost zárodku *Campylobacter fetus subsp. fetus*, který vyvolává u plemenic aborty a subfertilitu charakterizovanou zvýšeným přebíháním, vyšším inseminačním indexem, prodlužováním servis perrody a mezidobí. U býků má toto onemocnění charakter lokalizované, latentně probíhající infekce bez zjevných klinických změn a bez narušení kvality spermatu. Infikovaný býk je dlouhodobým nositelem a zdrojem infekce. Přes veškerou pozornost věnovanou preventivnímu vyšetřování býků ustájených na plemenářských stanicích se vyskytují případy abortů způsobené tímto zárodkem. Stále se vyskytují nosiči této infekce a přenášejí nákazu na mladé býky, infikovaným spermatem pak i na plemenic. Nález *Campylobacter fetus subsp. fetus* z abortovaných plodů zpětně napomáhá odhalit i zdroj infekce.

Jednou z příčin přetrvávání zárodků *Campylobacter fetus* v populaci skotu je skutečnost, že diagnostika tohoto zárodku je z mnoha důvodů obtížná a ne zcela spolehlivá. Přesná diagnostika je však základním předpokladem likvidace této nákazy, a to je zvláště důležité u býků, kteří jsou jejími hlavními šířiteli.

Hoppe (1966) prohlásil, že v mnoha zemích je virozoza zvláště metodou diagnostiky virozozy skotu. Takové laboratoře pak dosáhly diagnostických výsledků i na těch územích, kde dříve infekce diagnostikována nebyla. Bisping (1974) v souvislosti s obtížnou bakteriologickou diagnostikou u býků uvedl, že virozoza skotu je podstatně rozšířenější, než se všeobecně přiznává. Vlček (1966) poznamenal, že na mezinárodní konferenci v Haagu bylo konstatováno, že virozoza skotu je rozšířena ve 28 zemích. Gamčík a Sakala (1966) se zmínili o tom, že tvoří vážný národohospodářský problém ve více než 30 státech. V ČSSR se podle Krále (1967) vyskytla sporadicky; poprvé byla zjištěna Trunkátem (1954) na severní Moravě. Matoušek a Mikuláš (1971) uvedli 11 ohnisek virozozy pro rok 1965 a 14 ohnisek v roce 1966 v Jihomoravském kraji.

Podle Savova (1967) je jistá a přesná diagnostika základním předpokladem úspěšného boje s virozou. Má se za to, že kultivační průkaz průvodce je nejjistější metodou, jejíž efektivita je větší než u všech ostatních. Pro tuto metodu je však nepostradatelný vhodný, správně odebraný materiál a vhodné, kvalitní kultivační medium. Kultivační průkaz bývá často ztížený nebo úplně nemožný pro kontaminaci vyšetřovaného materiálu saprofytní mikroflórou (*Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, *E. coli* a mnoha dalšími zárodky). Její odstranění je možné částečně nebo úplně použitím určité techniky zpracování vzorku — je to odstředění, filtrace a přidávání vhodných chemikálií nebo antibiotik do kultivačního media. Kabelík (1964) zjistil, že při bakteriologickém vyšetřování prepuciálních výplasků se setkáváme s mnoha nevyřešenými potížemi. Cestu k řešení je nutné hledat v sestavě půd s vhodným složením, a proto navrhl modifikovaný játrový bujón. Nikdy nezjistil vibria přímo ve výplasku, takže nepokládá jejich kultivaci na krevní agar za zvlášť významnou.

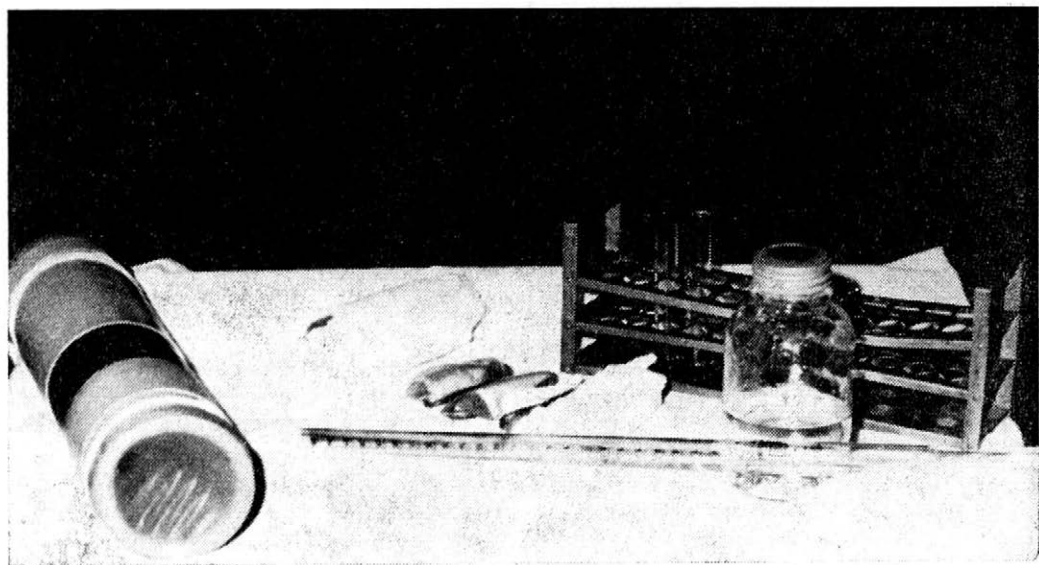
Winter aj. (1965) použili při vyšetřování spermatu techniky filtrace přes miliporové filtry o velikosti pórů $0,060 \mu$. Z 86 % vyšetřených vzorků identifikovali *V. fetus*. Dospěli k názoru, že pro vyloučení nosičství virozozy býků je nezbytná kultivace dvou až tří opakovaně odebraných vzorků spermatu. Dunn aj. (1965) vyšetřovali 11 let ejakuláty a za tuto dobu izolovali *V. fetus* ve 12 % odebraných vzorků. Dospěli k názoru, že vyšetřování prepuciálních výplasků na velkých inseminálních stanicích je nevhodné. Lehce dosažitelné jsou vzorky spermatu. Bingöl aj. (1970) uvádějí, že velmi vhodným materiálem k izolaci *V. fetus* jsou výplasky umělé vagíny, používané k odběru ejakulátů u býků. Filtrací získaného vzorku přes filtry o velikosti pórů $0,65 \mu$ se zabránilo růstu kontaminantů a podstatně se zvýšilo procento izolací na používaném cysteinovém krevním agaru. U 64 vyšetřených býků zjistili osmkrát *V. fetus*, 32x *V. bubulus* a třikrát obě současně.

Stejný názor zastává i Bisping (1974). Prepuciální výplasky a sperma uvádí až na druhém místě. K výplachu vagíny používal thio glykolátový bujón. Pokud doba transportu přesahuje šest až osm hodin, doporučuje použít tzv. transportní medium podle Stuarda. Ke kultivaci doporučuje Fluid-Thioglycollate-medium (Difco) s přidáním 2 % agaru a 10 % defibrinované hovězí krve. Tuto půdu doplňoval 0,22 % vodným roztokem brilantové zeleně nebo antibiotiky ve složení Bacitracin, Novobiocin a Polymyxin. Antibiotika v této živné půdě — vzdor nízké koncentraci — obecně používané — podle jeho názoru růst *V. fetus* ve značné míře potlačují. Clark (1974) při vyšetřování prepuciálních výplasků používal půdy tekuté, obohacené 5-fluoracilem, polymixinem, brilantovou zelení a cyklohexidinem. Tuto půdu po čtyřdenní inkubaci vyočkoval na selektivní pevnou půdu. Nakultivované misky inkuboval šest dnů při teplotě 37°C v atmosféře s 5 % CO_2 a 95 % N. Kontaminanty vyrostly na 11,7 % pevných půd v rozsahu 20 % povrchu. Ze 63 vzorků od devíti infikovaných býků izoloval v 57 vzorcích *V. fetus*.

MATERIÁL A METODA

V roce 1975 jsme při pravidelných prověrkách plemenných býků ustájených na plemenářských stanicích začali souběžně s prepuciálními lavážemi vyšetřovat i laváže umělých vagín, používaných k odběru ejakulátu (obr. 1). K laváží byl používán sterilní fyziologický roztok o teplotě přibližně 20°C v množství asi 20 ml. Krouživými pohyby jsme opláchli vnitřní stěny vagíny opatřené na obou koncích sterilními gumovými víčky (víčka proložená gázou byla sterilizována autoklavováním).

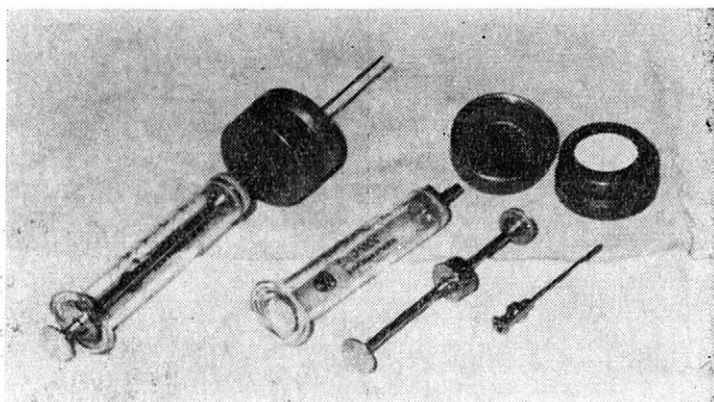
Vagínu jsme vypláchli ihned po odběru ejakulátu býka. Bezprostředně potom



1. Umělá vagina s víčky, včetně materiálu potřebného k odběru laváže — Artificial vagina with lids, including material needed for lavage collecting

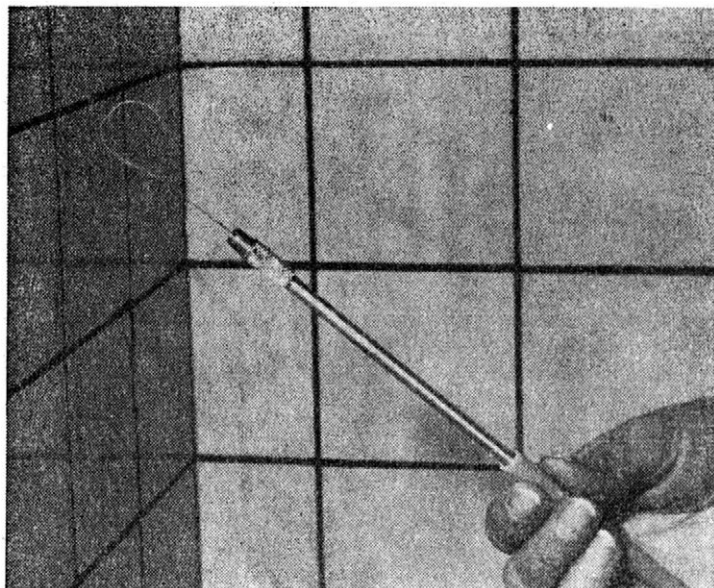
byla laváž zpracována v pojezdné veterinární laboratoři přímo na místě technikou filtrace přes membránové filtry takto: do injekční stříkačky se nasaje 5 ml laváže, na spodní část se nasadí přístroj pro membránovou filtraci MF 70 (obr. 2) Ø 25 mm s vloženým membránovým ultrafiltrem „Synpor“ o velikosti pórů $0,85 \mu$ a průměru kotoučku 24μ (u filtrů zahraniční výroby je udávána velikost pórů $0,65 \mu$). Na spodní díl přístroje se nasadí injekční jehla č. 24 (všechny použité přístroje byly

2. Filtrační zařízení MF 70 — Filtration equipment MF 70



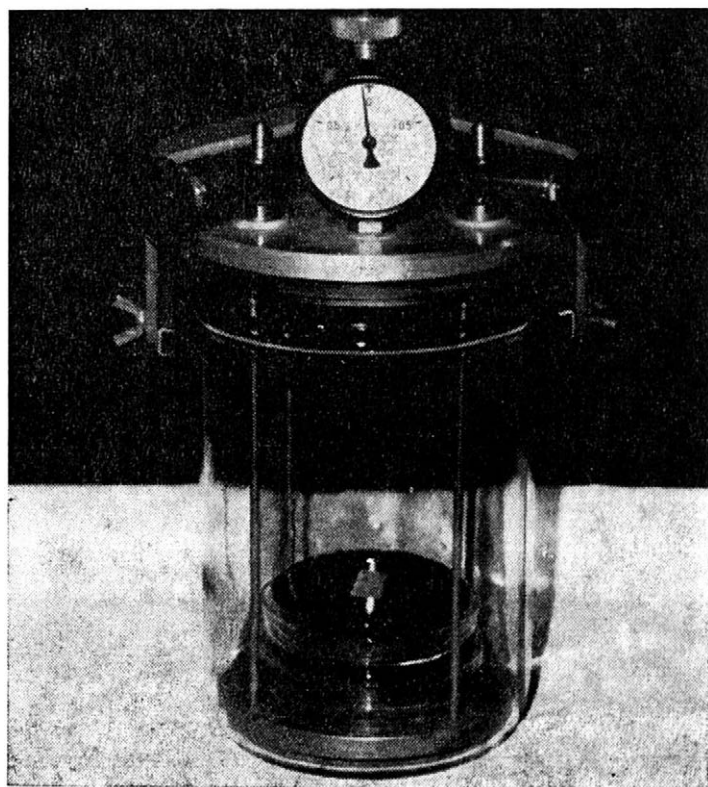
sterilizovány varem). Mírným tlakem na píst stříkačky se odfiltruje asi 3 ml laváže a zbývající 2 ml se filtrují na povrch živných medií (nejméně dvou). Na první plotnu se kultivuje jedna kapka, která se rozočkuje zředovacím způsobem. Na druhou plotnu se kultivují čtyři kapky filtrátu, které se upravenou bakteriologickou kličkou (obr. 3) rozprostřou po celé ploše živného media.

Z živných půd jsme používali Fluid thioglycollate medium (Difco) s přidavkem 2 % agaru, 10 % beraní krve a antibiotik v kombinaci Bacitracin 2500 jednotek, Novobiocin 5 mg na 0,5 l půdy a zároveň thioglykolátový agar (Imuna, Šarišské Michaľany) se stejným obsahem agaru, krve i antibiotik. Po předsušení v termostatu byly naočkované půdy umístěny do anaerostatu (obr. 4), odkud byl vývěvou odčer-



3. Upravená bakteriologická klička — Adapted bacteriological loop

4. Anaerostat — Anaerostat



pán vzduch a doplněn kysličník uhličitý (5–10 obj. %). V laboratoři byly pŮdy inkubovány při teplotě 37 °C po dobu čtyř až pěti týdnů v termostatu.

Narostlé kultury byly hodnoceny běžným způsobem používaným v bakteriologické laboratoři; suspektní kolonie byly podrobeny typizaci podle morfologických, biochemických a růstových vlastností (tab. I).

	Kataláza	NO ₃	H ₂ S v TSI	H ₂ S acetate	1 % glycin	3,5 % chlorid sodný	25 °C
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	—	—	—	—	—	+
subsp. <i>intestinalis</i>	+	—	+	+	+	—	+
subsp. <i>jejuni</i>	+	—	+	+	+	—	—
<i>Campylobacter sputorum</i> subsp. <i>sputor.</i>	—	+	+	+	+	—	+
subsp. <i>bubulus</i>	—	+	+	+	+	+	d
<i>Campylobacter fecalis</i>	+	—	+	+	+	d	—

VÝSLEDKY

Na sedmi plemenářských stanicích Východočeského kraje jsme vyšetřovali 128 býků, tzn., že jsme měli 128 dvojic vyšetření. Devět dvojic z tohoto počtu nebylo možné hodnotit, protože plotny přerůstaly saprofytní mikroflórou, nebo že se vyskytly technické závady v anaerobní kultivaci. Za pozitivní nález pro posouzení záchytnosti metodik byl považován nález kteréhokoliv zárodku rodu *Campylobacter*. Většina zachycených kmenů byla určena jako *Campylobacter sputorum* subsp. *bubulus*, méně *Campylobacter fecalis*. V jednom případě byl izolován *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, a to z laváže umělé vaginy.

Souhlasně pozitivní nález byl ve 22 případech, pozitivní pouze z laváže prepucia v deseti případech a pozitivní pouze z laváže umělé vaginy v devíti případech (tab. II).

Dosažené výsledky byly statisticky vyhodnoceny testem rovnosti parametrů alternativních rozdělení (Hátle, Likeš, 1972). Bylo prokázáno, že celkové procento záchytnosti činí u laváží prepucia 26,9 %, u laváží umělé vaginy 26,1 %. Rozdíl v procentu zachytu mezi oběma metodami není významný. Rovněž nevýznamný rozdíl je mezi chybou metodiky, za kterou je považován počet negativních nálezů získaných jednou metodou a současně pozitivních nálezů při použití metody druhé, které činí 24,4 % u laváží umělé vaginy a 22,0 % u laváží prepucia (tab. III).

II. Výsledky pokusů s vyšetřením laváží umělých pochev a laváží prepucia — Results of experiments with the check of lavages of artificial vaginas and lavages of the prepuce

Laváž		Počet dvojic
umělé pochvy	prepucia	
+	—	9
—	+	10
—	—	78
+	+	22
nehodnoceno		9

A. Vyhodnocení celkové záchytnosti:

	Pozitiv- ních	% záchy- tnosti
Laváž umělé vaginy	31	26,05
Laváž prepucia	32	26,89

Celkem hodnoceno 119 dvojic vyšetření

$u = 0,146941$

$P = 0,05$

Rozdíl mezi záchytností není průkazný

B. Vyhodnocení chyby v záchytu:

	Chybných	% chy- bných záchytů
Laváž umělé vaginy	10	24,39
Laváž prepucia	9	21,95

Celkem hodnocena 41 dvojice vyšetření s poziti-
vním nálezem alespoň jednou metodikou

$u = 0,261836$

$P = 0,05$

Rozdíl % chybných není významný

DISKUSE

Vibrióza skotu, jak vyplývá z literárního přehledu, je problémem celosvětovým. Zavedením umělé inseminace je však možné v daleko větším rozsahu likvidovat tuto nákazu pravidelnými preventivními vyšetřeními mladých býčků v odchovnách a býků na plemenářských stanicích, zařazených do plemenitby. Aby preventivní vyšetření splnila svůj význam, je třeba zvládnout její diagnostiku od odběru materiálu k vyšetření až po typizaci sledovaného zárodku. Jak uvádějí Hoppe (1966) a Bisping (1974), není tato diagnostika jednoduchá právě u býků, u kterých postrádáme zjevné klinické příznaky onemocnění. Pro úspěšnou diagnostiku je nepostradatelný vhodně a správně odebraný materiál. Protože se proces infekce odehrává na sliznici prepucia, jsou vedle spermatu běžně používaným materiálem prepuciální laváže. Ty používali k vyšetření i Winkenwerder a Maciak (1965), Roslanowski aj. (1972), Samol a Korpolińska (1974), Grigore a Daire (1964), Kabelík (1964), Dunn aj. (1965), Bisping (1974) a Clark (1974).

Nesnadný odběr prepuciálních laváží má za následek, že jsou často nekvalitní. Nedostatky se vyskytují i při dopravě materiálu do laboratoře. Laváže bývají dopravovány v láhvích naplněných jen z části, takže zbývající prostor je dostatečným zdrojem kyslíku, ke kterému je *Campylobacter* citlivý. Rovněž doba transportu bývá prodlužována. Materiál je třeba dopravit do šesti hodin po odběru v menších lahvičkách naplněných až po uzávěr. Je-li doba transportu delší, je izolace ztížena až nemožná, protože vzorek přerůstá saprofytní mikroflórou, popřípadě kultura přítomná v dopravovaném vzorku hyne.

Dunn aj. (1965) dospěli k názoru, že vyšetřování prepuciálních laváží na velkých plemenářských stanicích je nevhodné. Snadněji dosažitelné jsou vzorky spermatu z rutinního odběru. Podle všeobecných znalostí se dostává *Campylobacter fetus subsp. fetus* do spermatu z předkožky, nikoliv z varlat. Při současném používání zkrácených vagin je na jejich stěnách především zachyt z oteru praeputia a sliznice penisu a sekretu uretrálních žláz. Tento materiál obsahuje nejvíce zárodků, mezi nimi i *Campylobacter fetus subsp. fetus*. Při správném odběru spermatu je získaný ejakulát kontaminován jen velmi malým množstvím mikroorganismů, a tím je možnost záchytu ve spermatu snížena. Také

z ekonomického hlediska je výhodnější k vyšetření výplach, který má nepoměrně menší hodnotu než sperma, zejména u býků, kteří se později projeví jako zlepšovatelé.

Podle Bingöla aj. (1970) a Bispinga (1974) jsou velmi vhodným materiálem k izolaci *Campylobacter fetus* výplachy umělých vagin používaných k odběru ejakulátů býků.

Se zvyšujícími se koncentracemi býků na plemenářských stanicích rostou problémy se zajišťováním odběrů prepuciálních laváží. Proto bylo snahou pracovníků naší laboratoře ověřit vhodnost laváží umělých vagin k diagnostice v našich podmínkách. Výsledky vyšetření se velmi přibližují údajům těchto autorů.

Literatura

- BINGÖL, R. — BRÜCKLER, J. — BLOBEL, H.: Erkenntnisse bei der Vibrio-Diagnose bei Bullen. Tierärztl. Umschau, 25, 1970, s. 581-584.
- BISPING, W. J.: Zur bakteriologischen Diagnose der Vibrio-fetus Infektion beim Bullen. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 87, 1974, s. 330-333.
- CLARK, B.: Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* and *Campylobacter fetus* subsp. *intermedius* from prepuce secretions of bulls. Aust. vet. J., 50, 1974, s. 324-326.
- DUNN, H. O. — KARINA-WAGNER, W. C. — GILMAN, H. L.: Isolation of *Vibrio fetus* from bovine semen. Cornell Vet., 55, 1965, s. 220-229.
- GAMČÍK, P. — SAKALA, J.: Poruchy plodnosti hovädzieho dobytku. SVPL, Bratislava 1966.
- GRIGORE, C. — DARIE, P.: Cercetari privind imbunatatirea diagnosticului bacteriologic al vibriozei la taur. Lucr. Inst. Cerc. vet. Bioprep. Pasteur, 1, 1964, s. 145-153.
- HATLE, J. — LIKES, J.: Základy počtu pravděpodobnosti a matematické statistiky. SNTL, Nakal. Alfa, Bratislava 1972.
- HOPPE, R.: K problematice vibriózy u býků. Veterinářství, 16, 1966, s. 275-278.
- KABELÍK, V.: Použití modifikovaného jádrového bujónu k údržbě sbírkových kmenů vibrií a v laboratorní diagnostice vibriového zmetání. Vet. Med., Praha, 9, 1964, s. 361-372.
- KRÁL, J.: Vibrióza skotu a ovčí. Nakažlivé choroby hospodářských zvířat. Stát. zeměd. nakl., Praha 1967.
- MATOUŠEK, Z. — MIKULÁŠ, L.: Příspěvek k výskytu vibriózy býků. Veterinářství, 21, 1971, s. 179-182.
- ROSLANOWSKI, K. — LOSIŃSKI, T. — WYSZANOWSKI, J.: Vibriosis bei Bullen. Medycyna wet., 28, 1972, s. 104-107.
- SAMOL, S. — KROPOLŃSKA, M.: Zastosowanie filtrow membranowych w rutinowej diagnostyce metwika płodowego. Medycyna wet., 30, 1974, s. 246-249.
- SASOV, N.: Vibriosa po govedato. Bulgarian Academy of Sciences, Sofia 1967.
- TRUNKÁT, J.: Osobní sdělení. 1954.
- VLČEK, Z.: Současný stav poznatků o vztahu infekce k reprodukci skotu. Veterinářství, 16, 1966, s. 350-353.
- WINKERWERDER, W. — MACIAK, T.: Das Vorkommen von Vibrionen bei Rindern in Norddeutschland. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 78, 1965, s. 161-165.
- WINTER, aj.: — vynechat dva řádky —

Došlo dne 22. 7. 1977

МАЗУРОВА, И. — ЙИРАНЕК, Е. — СЕЛИНГЕР, П. — ДОУБРАВОВА, Л. — ДВОРЖАКОВА, В. (Государственный ветеринарный институт, Пардубице): Диагностика вибриоза у быков на племях с помощью лаважей искусственных маток. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 267-274.

Цель работ состояла в проверке пригодности промывок искусственных вагин, используемых

для взятия эякулята для диагностирования зародыша *Campylobacter fetus subsp. fetus*. Как показывают результаты, этот метод можно считать равноценным методу промывки препуция. Но следует подчеркнуть его преимущества: он устраняет опасность рабочих ушибов, позволяет качественно проводить промывку в лаборатории. Для выявления зародыша *Campylobacter fetus* сужит техника фильтрации через мембранные фильтры с использованием культивационной среды Fluid Thioglycollate medium (Difco) с добавкой агара, 10 % бараньей крови и антибиотиков (бацитрацин, новобиоцин). Процент выявления составляет у промывок препуция 26,9 %, а искусственной вагины — 26,1 %. Незначительная разница между ошибкой методики, которой считается число отрицательных диагнозов с помощью одной методики при одновременных положительных диагнозах при применении второй составляет 24,4 % у промывки вагины и 22,0 % у промывки препуция.

Campylobacter fetus subsp. fetus; метод культивации; промывка; искусственная вагина; крупный рогатый скот

MAZUROVÁ, J. — JIRÁNEK, E. — SELINGER, P. — DOUBRAVOVÁ, L. — DVOŘÁKOVÁ, V. (State Veterinary Institute, Pardubice): *Diagnostics of Vibriosis in Bulls on Breeding Stations by Lavages of the Artificial Vagina*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 267-274.

The objective of the study was to test the suitability of lavages of artificial vaginas which are used for collecting ejaculate for diagnosing the *Campylobacter fetus subsp. fetus* germs. According to the results of the investigation this method may be considered equal to the method of lavages of the prepuce. However, it is important to point out the advantages: it eliminates the danger of an accident, it enables quality lavage in the laboratory. To capture the *Campylobacter fetus* the filtration through diaphragm filters is used together with the culture medium Fluid Thioglycollate medium (Difco) with an additive of agar, 10 % ram blood and antibiotics (bacitracin, novobiocin). The catch rate in the prepuce lavages is 26.9 %, in lavages of the artificial vagina 26.1 %. The insignificant difference between the errors of the methods, i. e. the number of negative findings by employing one method and positive results with the other method, is 24.4 % in lavages of the artificial vagina and 22.0 % in lavages of the prepuce.

Campylobacter fetus subsp. fetus; method of cultivation; lavage; artificial vagina; cattle

MAZUROVÁ, J. — JIRÁNEK, E. — SELINGER, P. — DOUBRAVOVÁ, L. — DVOŘÁKOVÁ, V. (Staatliches Veterinärinstitut, Pardubice): *Die Vibriosebestimmung bei Bullen in Zuchtstationen durch Lavagen der künstlichen Vagina*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 267-274.

Die Arbeit steckt sich zum Ziel die Zweckmäßigkeit der Lavagen der zur Samenentnahme benutzten künstlichen Vagina bei der Diagnose der Keime von *Campylobacter fetus subsp. fetus* zu untersuchen. Aufgrund der beobachteten Ergebnisse kann diese Methode als gleichwertiger Ersatz für die Vorhautlavage betrachtet werden. Wir müssen aber auch ihre Vorteile betonen: sie eliminiert die Gefahr eines Arbeitsunfalles, ermöglicht eine gute Ausspülung in Ruhe im Labor. Zum Auffangen des Keimes *Campylobacter fetus* dient die Filtration durch Membranenfilter bei gleichzeitiger Benutzung von Fluid Thioglycollate medium (Difco) als Kultivierungsmedium mit Zusatz von Agar, von 10 % Schaffbockblut und von Antibiotika (Bazitrazin, Novobiozin). Der Auffangsprozentsatz beträgt im Falle der Lavagen von Vorhaut 26,9 %, im Falle der Lavagen der künstlichen Vagina 26,1 %. Der bedeutungslose Unterschied zwischen dem Methodikfehler, für den die Anzahl von negativen Befunden mit Hilfe einer Methodik bei gleichzeitig positiven Befunden bei der Benutzung der anderen Methodik gehalten wird, beträgt 24,4 % bei den Lavagen der künstlichen Vagina und 22,0 % bei den Lavagen von Vorhaut.

Campylobacter fetus subsp. fetus; Kultivierungsmethode; Lavage; künstliche Vagina; Rind

Adresa autorů:

MVDr. Jaroslava Mazurová, MVDr. Evžen Jiránek, MVDr. Pavel Selinger, Lydie Doubravová, Vlasta Dvořáková, Státní veterinární ústav, Štросsova 57, 530 03 Pardubice

D. Zajíček

ZAJÍČEK, D. (Ústřední státní veterinární ústav, Praha): *Srovnání efektivity dvou kvantitativních ovoskopických metod.* Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 275-282.

Porovnání efektivity kvantitativního průkazu vajíček gastrointestinálních nematodů v trusu ovcí metodami podle Brezy a Švarce (1968) a Wetzela (1951), modifikovanými na přepočítání vajíček pomocí McMasterovy komůrky, prokázalo zachytivost vajíček v mezích spolehlivosti 95 až 99 %. Účinnost obou metod je přímo vázána na intenzitu invazí, ovulační aktivitu nematodů v příslušném ročním období a v neposlední řadě na věk nositele. Exaktnějších výsledků se dosahuje při experimentálních invazích známou dávkou invazních larev než u přirozených invazí ovlivněných ekologickými faktory. Podle početního stavu vajíček lze přibližně určit intenzitu invaze ve vztahu k ročnímu období, věku zvířete a pastevním podmínkám.

koprologické metody; ovce; gastrointestinální nematodózy; kvantitativní efektivity

S rozvojem screeningu nově vyvíjených léčiv proti gastrointestinálním nematodózám se dostává do popředí otázka vhodného hodnocení výdeje vajíček kvantitativními koprologickými metodami u ovcí a skotu. Metodiku kvantitativního stanovení počtu vajíček pomocí objemových měr v určitém hmotnostním množství trusu propracoval Stoll (1923), později ji modifikovali Zschücke (1931) a Nemeséri, Holló (1964). Coffin (1966) stanovoval počet vajíček v určitém hmotnostním množství trusu suspendovaného ve známém objemu vody. Gordon a Whitlock (1939) používali flotační metodu (nasycený roztok chloridu sodného) a nálezy vajíček kvantitativně hodnotili pomocí McMasterovy komůrky. Tuto metodiku převzal a zlepšil Wetzel (1951). Hovorka (1949) navrhl k počítání vajíček strongylidů koní komůrku vlastní konstrukce při použití nasyceného roztoku cukru jako flotačního média.

MATERIÁL A METODA

Porovnávali jsme efektivity dvou kvantitativních ovoskopických metod: a) metodu podle Wetzela (1951), používající McMasterovy počítací komůrky; jako flotační medium byl použit Brezův flotační roztok (nasycený roztok $\text{MgSO}_4 \cdot \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 3 : 3 : 1), b) metodou podle Brezy a Švarce (1968).

Obě metody jsou založeny na principu centrifugace a flotace. Počáteční způsob

zpracování spočívá na přípravě suspenze z 1 g vyšetřované trusu v 10 ml vody přecezené do zkumavky a odstředěné po dobu 1–2 min. při 2000 ot. min⁻¹. Po slití supernatantu se sediment opláchné vodou. V dalším zpracování se metody liší. Při metodě Wetzellové (1951) se sediment převrství 10 nebo 5 ml flotačního roztoku podle Brezy (1959), důkladně se promísí, centrifuguje po dobu 1 minuty při 2000 ot. min⁻¹. Před plněním McMasterovy komůrky se flotovaná vajíčka rozptýlí v supernatantu tím, že se zkumavka převrací (dvakrát až třikrát) a pipetou se naplní oba její oddíly. Součet vajíček nalezených ve vyznačených čtvrcích obou oddílů se násobí při použití 10 ml roztoku číslem 66 nebo při použití 5 ml roztoku číslem 33. Číselné koeficienty odpovídají objemu 0,15 ml počítací komůrky, tj. 1/66 z 10 ml a 1/33 z 5 ml. Výsledek udává počet vajíček v 1 g trusu (E. P. G. — Eggs per gram).

Při modifikované metodě podle Brezy a Švarce (1968) se na sediment navrství 1,5 ml flotačního roztoku podle Brezy (1959), sediment se rozmíchá skleněnou paličkou a převrství 3,5 ml vody. Rozhraní obou tekutin musí být ostré. Následuje centrifugace po dobu 1 min. při 2000 ot. min⁻¹ a po ní se tekutiny převrácením promísí, aniž by se poškodil sediment. Z této suspenze se nanesou pipetou tři kapky o objemu 0,05 ml do tří jamek podložního sklíčka. Po třiminutovém ustátí se počítají vajíčka v jednotlivých jamkách. Jejich součet se dělí 3 a násobí číslem 100. Výsledek udává počet vajíček v 1 g trusu (E. P. G.).

Oběma metodami jsme vyšetřili celkem 173 ovčích trusů, a to u skupiny osmi přirozeně invadovaných ovcí v podzimním období (říjen), sledovaných po dobu 29 dnů, jednorázově u deseti přirozeně invadovaných ovcí v podzimním období (konec listopadu) s ověřením invaze helmintologickou pitvou a u pěti jehňat experimentálně invadovaných nematody *Haemonchus contortus* a *Trichostrongylus colubrifomis*, sledovaných po dobu 47 dnů s průkazem invaze helmintologickou pitvou jednoho jehněte. Vzorky k vyšetření se odebíraly mezi šestou až sedmou hodinou ranní (Sciranka, 1961).

K hodnocení dosažených výsledků jsme použili *t*-testu.

VÝSLEDKY

Srovnání efektivnosti obou metod podalo důkaz o jejich spolehlivosti u všech tří skupin ovcí. U první skupiny osmi jednoročních při-

I. Průměrné hodnoty počtu vajíček (E. P. G.) v trusu při použití obou metod a porovnání jejich efektivnosti — Average counts of eggs (E. P. G.) in the faeces by employing both methods and the comparison of their efficiency

Vyšetření	Metoda podle Wetzela (1951)			Metoda podle Brezy a Švarce (1968)			Účinnost (%)	
	min.	max.	průměr	min.	max.	průměr	metoda Wetzela (1951)	metoda Breza, Švarc (1968)
6. X.	66	825	263,9	99	798	255,9	100,0	96,8
13. X.	198	1320	446,0	198	1298	422,0	100,0	94,6
15. X.	231	1088	634,0	365	1099	640,0	100,0	100,9
19. X.	495	1650	825,0	498	1631	823,0	100,0	99,7
22. X.	165	1056	578,0	132	1030	594,0	100,0	102,8
23. X.	198	1353	861,0	198	1365	778,0	100,0	90,3
25. X.	99	2343	792,0	66	2264	760,0	100,0	97,3
26. X.	333	2606	1480,0	432	2666	1481,0	100,0	100,1
27. X.	759	2706	1640,0	665	2525	1276,0	100,0	77,8
28. X.	594	3663	1329,0	532	3531	1289,0	100,0	96,8
30. X.	264	1549	674,0	199	1698	666,0	100,0	99,1
3. XI.	198	20658	4026,0	198	15964	3193,0	100,0	79,3

II. Porovnání intenzity invaze nematodů u ovcí s počtem nalezených vajíček v trusu (E. P. G.) pomocí sledovaných metod — Comparison of nematode infection intensity in sheep with the number of eggs found in the faeces (E. P. G.) by the investigated methods

Ovce č.	Metoda H. p. (+) W. (++) B + Š. (+++)	O. (1)	T. (2)	B. (3)	CH. (4)	S. (5)	N. (6)	Oes. (7)	Tcp. (8)	Celkem nematodů; celkem E. P. G.	Účinnost (%)
1	H. p. 0/♀ W. B + Š.	10/16 924 760	1/1 198 230	11/8 66 30	8/12 1287 1130	-/22 264 260	1/13 — 60	4/8 66 200	— — —	35/80 2805 1670	100,0 — 59,5
2	H. p. W. B + Š.	2/4 33 —	— — —	-/7 — —	2/2 30 —	— — —	— — —	— — —	— — —	4/13 63 —	— — —
3	H. p. W. B + Š.	3/8 66 30	2/6 33 30	5/8 — —	6/8 132 160	-/10 33 30	— — —	— — —	9/14 — —	25/54 264 250	100,0 — 94,7
4	H. p. W. B + Š.	2/11 66 —	— — —	-/3 — —	1/5 33 —	-/8 — —	— — —	— — —	— — —	3/27 99 —	— — —
5	H. p. W. B + Š.	3/7 33 30	1/5 66 100	7/7 99 100	— — —	— — —	— — —	— — —	— — —	11/19 198 230	100,0 — 116,2
6	H. p. W. B + Š.	8/21 198 160	9/3 33 30	-/8 — —	6/18 396 330	-/15 66 60	2/11 — —	3/16 — —	— — —	22/90 693 580	100,0 — 83,7
7	H. p. W. B + Š.	3/9 132 130	1/6 33 30	2/14 — —	3/8 132 100	-/2 — —	— — —	-/4 — —	— — —	9/43 307 260	100,0 — 84,7
8	H. p. W. B + Š.	1/10 33 30	1/6 — —	-/2 — —	7/5 66 30	— — —	— — —	1/3 — —	— — —	10/26 99 60	100,0 — 60,6
9	H. p. W. B + Š.	2/8 33 30	1/- — —	-/2 — —	3/12 99 100	-/4 — —	1/2 — —	3/6 — —	— — —	10/34 132 130	100,0 — 98,5
10	H. p. W. B + Š.	1/6 — 30	1/3 — —	-/2 — —	1/12 — —	-/1 — —	— — —	4/12 — —	— — —	7/36 — 30	— — —

Vysvětlivky: +) H. p. — helmintologická pitva; ++ W. — metoda podle Wetzela (1951); +++ B + Š. — metoda podle Brezy, Švarce (1968)

(1) *Ostertagia circumcincta*; (2) *Trichostrongylus colubriformis*; (3) *Bunostomum trigonocephalum*; (4) *Chabertia ovina*; (5) *Strongyloides papillosus*; (6) *Nematodirus filicollis*; (7) *Oesophagostomum venulosum*; (8) *Trichocephalus ovis*

rozeně invadovaných ovcí, vyšetřovaných po dobu 29 dnů v podzimním vrcholu výdeje vajíček, jsme prokázali početně téměř shodné nálezy ve stejných vzorcích trusu. Výsledky vyšetření jsou uvedeny v tab. I s vyznačením minimálních, maximálních a průměrných hodnot E. P. G.

III. Experimentální invaze jehňat: průměrné hodnoty E. P. G. zjištěné pomocí sledovaných metod — Experimental infection of lambs: average E. P. G. values determined by the investigated methods

Počet dní po experimentální invazi	<i>Haemonchus contortus</i>		<i>Trichostrongylus colubriformis</i>		Celkový počet vajíček (E. P. G.)		Účinnost (%)	
	W.+)	B+Š++)	W.	B+Š	W.	B+Š	W.	B+Š
7	—	—	—	—	—	—	—	—
14	—	—	—	—	—	—	—	—
28	—	—	46	32	46	32	100	69,6
32	1 823	1 798	574	585	2 397	2 383	100	99,4
35	3 637	3 582	1320	1254	4 957	4 836	100	97,6
39	12 540	12 485	2059	2030	14 599	14 515	100	99,4
42	31 887	31 892	3077	3108	34 964	35 000	100	100,1
45	33 017	32 936	4407	4396	37 424	37 332	100	99,8
46	30 676	30 684	2284	2292	32 960	32 976	100	100,05
47	18 635	19 020	2330	2345	20 965	21 365	100	101,9

Vysvětlivky: +) W. — metoda podle Wetzela (1951); ++) B+Š — metoda podle Brezy a Švarce (1968)

IV. Porovnání počtu nematodů získaných helmintologickou pitvou experimentálně invadovaného jehněte s počtem vajíček v trusu podle obou sledovaných metod — Comparison of the counts of nematodes obtained by helminthological dissection of an experimentally infected lamb with the egg count in the faeces according to both investigated methods

Druh nematodů	Metoda (E. P. G.)		Efektivnost (%)	
	Wetzel (1951)	Breza, Švarc (1968)	Wetzel (1951)	Breza, Švarc (1968)
<i>Haemonchus contortus</i> celkem: 4064 samiček: 2178 samců: 1886	26 369	26 402	100,0	100,13
<i>Trichostrongylus colubriformis</i> celkem: 875 samiček: 669				
	6 699	6 459	100,0	96,42
<i>H. contort.</i> + <i>T. colubr.</i> celkem: 4939 samiček: 2847 samců: 2092	33 068	32 861	100,0	99,37

Vyjádření efektivity v procentech u metody podle Brezy a Švarce (1968) je propočítáno v poměru k metodě Wetzelově (1951). U této skupiny jsme neměli možnost konfrontovat ovoskopické nálezy s výsledky helmintologické pitvy, protože ovčím byl v posledním dnu vyšetření podán Nilverm.

U deseti dvouletých přirozeně invadovaných ovcí, vyšetřených jednorázově ovoskopicky před porážkou, byly výsledky obou metod konfrontovány s nálezem nematodů při helmintologické pitvě zaživacího traktu a bylo konstatováno, že dokazují poměrně dobrou záchytnost vylučovaných vajíček vzhledem k nízké intenzitě invazí u starších zvířat a k odeznění ovulační aktivity samic (vyšetřovali jsme koncem listopadu) — (tab. II). Přesto však se nepodařilo v některých případech vyjádřit efektivitu porovnání obou metod.

Průkazné výsledky efektivity obou metod poskytla experimentální invaze pěti jehňat ve věku čtyři měsíce, sledovaná do období maximálního vylučování vajíček (po dobu 47 dnů). Jehňata byla invadována larvami *Haemonchus contortus* a *Trichostrongylus colubriformis*. Jak je uvedeno v tab. III, výsledky záchytnosti vajíček oběma metodami se od sebe příliš nelišily v počtech a vzájemný poměr efektivnosti byl velmi vysoký. Při helmintologické pitvě uhynulého jehněte z této skupiny následkem intenzity invaze *H. contortus* a *T. colubriformis* potvrdili jsme si přímý vztah spolehlivosti porovnávaných metod k početnosti invaze (tab. IV).

Ve třech skupinách vyšetřovaných ovcí zachytily obě metody téměř shodně výdej vajíček a jejich vzájemné statistické hodnocení *t*-testem neprokázalo signifikantní odchylku záchyty vajíček při silných invazích v mezích spolehlivosti 95 až 99 %.

DISKUSE

McMasterova počítačí komůrka se běžně používá k hodnocení nálezů vajíček (Wilson, 1957; Levine aj., 1960; Kingsbury, 1965; Tagle, 1965; Michel, 1968; Pfeiffer, 1968; Silverman aj., 1970), přičemž se při zpracování trusu používají různé flotační roztoky (Sheather, 1923 — roztok cukru; Faust, 1938 — 34% roztok $ZnSO_4$) při metodickém postupu přímé centrifugace a flotace (D. C. F.). V našem případě se plně osvědčil flotační roztok podle Brezy (1959).

Protože většina autorů při screeningu léčiv pracuje s experimentálními invazemi, mizí nebezpečí chybných výsledků z rozdílné disperzity vajíček v jednotlivých bobcích trusu, která může do jisté míry ovlivnit efektivnost použité koprologické metodiky u přirozeně invadovaných ovcí (Besch aj., 1960). Tyto nepatrné změny jsme měli možnost pozorovat u první skupiny ovcí, u nichž jsme zachytili dynamiku vylučování vajíček po dobu 29 dnů. Tímto zjištěním lze vysvětlit i kolísání efektivnosti užitých metod při procentuálním hodnocení. Mimo tento jev dochází i k rozdílnému vylučování vajíček během jednoho i několika dnů (Spedding, 1953). Případným výkyvům v nálezech jsme se snažili předejít pravidelným odběrem vzorků trusu v ranních hodinách, kdy trus obsahuje nejvíce vajíček nashromážděných v nočních hodinách (Sciranka, 1961).

Početnost vajíček zachycených kvantitativními ovoskopickými metodami signalizuje sílu invaze, jak dokázali Morgan aj. [1950], Crofton [1957], Lax [1967], Michel [1967], Rubin [1967], Breza a Švarc [1968] a Malczewski [1971]. Údaje citovaných autorů potvrdilo ovoskopické i pitevni vyšetření uhynulého experimentálně invadovaného jehněte a demonstrovalo efektivitu obou metod, neboť oba druhy nematodů — *H. contortus* a *T. colubriformis* — kladou na vrcholu invaze velké množství vajíček [Lax, 1967]. Ostatní naše výsledky potvrdily údaje Morgana aj. [1950], Croftona [1957] a Brezy a Švarce [1968] o možnosti přibližného stanovení síly invaze *in vivo*.

U přirozeně invadovaných ovcí hraje ovšem v nálezech vajíček významnou úlohu dynamika ovulace samic v určitém ročním období a v neposlední řadě věk hostitele [Taylor, 1935; Hovorka, 1963]. Poznatky obou autorů potvrdily převážně vyrovnané ovoskopické nálezy u ročních ovcí v období podzimního vrcholu ovulace samic, zatímco poměrně nízká zachytlost vajíček při slabé invazi dvouletých ovcí vyšetřovaných v pozdním podzimu byla podstatně ovlivněna odezněním ovulace, věkem zvířat a konečně i příznaky tzv. „self-cure“ — samovolným odchodem cizopasníků, jak jej popisují Stoll [1929] a Gordon [1948].

Literatura

- BESCH, E. D. — MORRISON, R. D. — WEEKS, D. L.: A preliminary report on the variation in number of nematode eggs demonstrated in individual fecal pellets of sheep. *Am. J. vet. Res.*, 21, 1960, s. 917-918.
- BREZA, M.: Zlepšenie metodiky koproovoskopického vyšetřovania trusu ošípaných s použitím nového flotačného roztoku a mukogélu. *Vet. Čas.*, 8, 1959, s. 569-576.
- BREZA, M. — ŠVARC, R.: Eine einfache Methode zur Bestimmung der Eierzahl gastrointestinales Strongylaten aus dem Faeces der Wiederkäuer. *Studia Helminthologica*, 2, 1968, s. 89-98.
- COFFIN, D. L.: Laboratorio clinico en medicina veterinaria. Edition revolutionaria, La Habana 1966.
- CROFTON, H. D.: Nematode parasite populations in sheep on lowland farms. I. Worm egg counts in ewes. *Parasitology*, 44, 1954, s. 465-477.
- CROFTON, H. D.: Nematode parasite populations in sheep on lowland farms. III. Seasonal incidence of species. *Parasitology*, 47, 1957, s. 304-318.
- FAUST, E. C.: A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cyst and helminth eggs in faeces. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 18, 1938, s. 169-183.
- GORDON, H. M.: The epidemiology of parasitic diseases with special reference to studies with nematode parasites of sheep. *Aust. vet. J.*, 24, 1948, s. 17-44.
- GORDON, H. M. — WHITLOCK, H. V.: A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. *J. Council. Sci. Indust. Res. Aust.*, 12, 1939, s. 50-52.
- HOVORKA, J.: Nová metoda kvantitativního určování endoparasitárných vajíček. *Čas. čs. vet.*, 4, 1949, s. 369-372.
- HOVORKA, J.: Helminthologická diagnostika. I. Laboratorní diagnostika helmintóz. SAV, Bratislava 1954.
- HOVORKA, J.: Helminty a helmintohostitelské vzťahy. SAV, Bratislava 1963.
- KINGSBURY, P. A.: Relationship between egg counts and worm burdens of young sheep. *Vet. Rec.*, 77, 1965, s. 900-901.
- LAX, T.: Současný stav červivosti slezové a střevní (*Trichostrongylidózy*) u skotu na pastvinách. *Veterinářství*, 17, 1967, s. 16-19.
- LEVINE, N. D. — MEHRA, K. N. — CLARK, D. T. — AVES, J. I.: A comparison of nematode egg counting techniques for cattle and sheep feces. *Am. J. vet. Res.*, 21, 1960, s. 511-515.
- MALCZEWSKI, A.: Experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. Para-

- sitology and pathogenesis of single infection. Pathology of Parasitic Diseases, Purdue Univ. Stud., Lafayette, Ind., 1971, s. 309-316.
- MICHEL, J. F.: Regulation of egg output of populations of *Ostertagia ostertagi*. Nature, 215, 1967, s. 1001-1002.
- MICHEL, J. F.: Faecal egg counts in infections of gastrointestinal nematodes in cows. Vet. Res., 82, 1968, s. 132-133.
- MORGAN, D. O. — PARNELL, J. W. — RAYSKI, C.: Further observations on the seasonal variation in worm egg count in Scottish hill sheep. J. Helminth., 24, 1950, s. 101-102.
- NEMESÉRI, L. — HOLLÓ, F.: Tierärztliche parasitologische Diagnostik. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1964.
- PFEIFFER, H.: Zum quantitativen Nachweis paratitärer Objekte in Kotproben. Zentbl. VetMed., B, 15, 1968, s. 895-898.
- RUBIN, R.: Some observations on the interpretation of fecal egg counts. Am. J. vet. Clin. Path., 1, 1967, s. 145-148.
- SCIRANKA, J.: Príspevok k dennej dynamike defekácie oviec z hľadiska kvantitatívneho hodnotenia helmintoovoskopických metod. [Diplomová práca.] Košice 1961. — Vysoká škola veterinárska.
- SHEATHER, A. L.: The detection of worm eggs in the feces of animal and some experiments in the treatment of parasitic gastritis in cattle. J. comp. Path. Therap., 36, 1923, s. 71-90.
- SILVERMAN, P. H. — MANSFIELD, M. E. — SCOTT, H. L.: *Haemonchus contortus* infection in sheep: Effects of various levels of primary infections on nontreated lambs. Am. J. vet. Res., 31, 1970, s. 841-857.
- SPEDDING, C. R. W.: Variation in the egg content of sheep faeces within one day. J. Helminth., 26, 1952, s. 71-86.
- SPEDDING, C. R. W.: Variation in the nematode egg content of sheep faeces from day to day. J. Helminth., 27, 1953, s. 9-16.
- STOLL, N. R.: An effective method of counting hookworm eggs in feces. Am. J. Hyg., 3, 1923, s. 59-70.
- STOLL, N. R.: Studies with the strongyloid nematode — *Haemonchus contortus*. I. Acquired resistance of host under natural reinfection conditions out of doors. Am. J. Hyg., 10, 1929, s. 384-410.
- STOLL, N. R.: On methods of counting nematode ova in sheep dung. Parasitology, 22, 1930, s. 116-136.
- TAGLE, I.: Recuento de nématodos gastrointestinales de ovinos y vacunos. (Adaptación del método de Whitlock.) Boll. Chil. Parasit., 20, 1965, s. 16-18.
- TAYLOR, E. L.: Seasonal fluctuations in the number of eggs of trichostrongylid worms in the faeces of ewes. J. Parasit., 21, 1935, s. 175-179.
- WETZEL, R.: Verbesserte McMaster-Kammer zum Auszählen von Wurmeiern. Tierärztl. Umsch., 6, 1951, s. 209-210.
- WHITLOCK, H. V.: Some modifications of the McMaster helminth egg counting technique and apparatus. J. Council Sci. Indust. Res. Aust., 21, 1948, s. 177-180.
- WILSON, G. I.: Comparison of the DCF and McMaster egg counting techniques as applied to nematode parasitism of sheep. J. Parasit., 43, 1957, suppl. 20.

Došlo dne 10. 8. 1977

ЗАИЧЕК, Д. (Центральный государственный ветеринарный институт, Прага): Сравнение эффективности двух количественных овоскопических методов. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 275-282.

Сравнение эффективности количественного доказательства яиц гастроинтестинальных нематод в помете овец по методам Бреззи-Шварца (1968) и Ветцеля (1951) в модификации на пересчет яиц с помощью камеры МекМастера показало выявляемость яиц в размере 95—99% в пределах надежности. Эффективность обоих методов прямо пропорциональна интенсивности инвазий, овулируемости нематод в данный годовой период и, в последнюю очередь, возрасту хозяина. Более подробные данные можно получить в ходе экспериментальных инвазий посредством известной дозировки инвазийных личинок, чем в ходе естественных инвазий, находящихся под влиянием экологических

факторов. На основе численности яиц можно приблизительно определить интенсивность инвазии по отношению к времени года, возрасту животного и условиям пастбы.

копрологические методы; овцы; гастроинтестинальные нематоды; количественная эффективность

ZAJÍČEK, D. (Central State Veterinary Institute, Praha): *Comparison of Efficiency of Two Quantitative Ovoscopic Methods*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 275-282.

A comparison of efficiency of a quantitative proof of the eggs of gastrointestinal nematodes in the faeces of sheep by methods after Breza and Švarc (1968) and Wetzel (1951) modified for the recalculation of eggs by McMaster's chamber showed a 95 to 99 % capture rate of eggs within the limits of reliability. The efficiency of both methods depends on the infection intensity, ovulation activity of the nematodes in the particular season of the year and, last but not least, on the age of the host. More accurate results are obtained in experimental infections by a known dose of larvae than in natural infections influenced by ecological factors. From the number of eggs it is possible to estimate the intensity of infection in relation to the season of the year, the age of the animal and grazing conditions.

coprological methods; sheep; gastrointestinal nematodes; quantitative efficiency

ZAJÍČEK, D. (Staatliches Zentralveterinärinstitut, Praha): *Der Effektivitätsvergleich von zwei quantitativen ovoskopischen Methoden*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 275-282.

Der Effektivitätsvergleich der quantitativen Bestimmung der Eier von gastrointestinalen Nematoden im Schafkot mit Hilfe von Methoden von Breza, Švarc (1968) und Wetzel (1951) die auf Umrechnung der Eier mit Hilfe der McMaster's Kammer modifiziert worden waren, wies 95 bis 99 % aufgefangene Eier in den Zuverlässigkeitsgrenzen auf. Die Wirksamkeit beider Methoden ist direkt an die Invasionsintensität, die Ovulationsaktivität der Nematoden im gegebenen Jahreszeitabschnitt und nicht zuletzt auch an das Alter des Wirtes gebunden. Bessere, exaktere Ergebnisse können bei den Versuchsinvasionen mit der bekannten Gabe von Invasionslarven als bei den natürlichen durch ökologische Faktoren beeinflussten Invasionen erzielt werden. Anhand der Anzahl von Eiern kann die Intensität der Invasion in Abhängigkeit vom Jahreszeitabschnitt, vom Alter des gegebenen Tieres und von Weidebedingungen annähernd bestimmt werden.

koprologische Methoden; Schafe; gastrointestinale Nematoden; quantitative Effektivität

Adresa autora:

MVDr. Dalibor Zajíček, CSc., Ústřední státní veterinární ústav, Sídliště 156, 165 03 Praha 6 - Lysolaje

EFEKTIVNOST ANTIGÉNOV Z RÔZNYCH VÝVINOVÝCH ŠTÁDIÍ *ASCARIS SUUM* PRI DÔKAZE MIGRAČNEJ FÁZY EXPERIMENTÁLNEJ ASKARIDÓZY U OŠÍPANÝCH

Z. Borošková, M. Benková

BOROŠKOVÁ, Z. — BENKOVÁ, M. (Helmintologický ústav SAV, Košice): *Efektívnosť antigénov z rôznych vývinových štádií Ascaris suum pri dôkaze migračnej fázy experimentálnej askaridózy u ošípaných*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 283-287.

Preverenie efektívnosti antigénov pripravených z rôznych vývinových štádií *Ascaris suum* v nepriamom hemaglutinačnom teste, pri dôkaze migračnej fázy experimentálnej askaridózy ošípaných ukazuje, že antigén pripravený ultrazvukom z invázneho larválneho štádia *A. suum* v porovnaní s antigénmi pohlavne zreých štádií má vyššiu sérologickú aktivitu. Použitím tohto antigénu možno dokázať špecifické protilátky u experimentálne invadovaných prasiat od 6. do 120. dňa po invázii, na rozdiel od ostatných skúšaných antigénov (detekovateľnosť protilátok medzi 7. až 8. dňom do 64. dňa po invázii).

Ascaris suum; antigény; sérologická aktivita; migračná fáza; ošípané

Pri imunodiagnostike migračnej fázy experimentálnej askaridózy ošípaných sa používajú prevažne antigény izolované z pohlavne zreých štádií *Ascaris suum*. Využitie antigénov z larválnych štádií askaríd sa v tomto smere nevenuje dostatočná pozornosť, i keď za symptómy tohto ochorenia v postinváznej fáze sú zodpovedné larvy. Larválne štádium askaríd sa považuje aj za významný stimulátor imunity v hostiteľskom organizme (S o u l s b y, 1960)

V práci sme preverili efektívnosť antigénov pripravených z invázneho larválneho štádia a z pohlavne zreých *A. suum* v nepriamom hemaglutinačnom teste pri dôkaze migračnej fázy experimentálnej askaridózy u špecifického hostiteľa.

MATERIÁL A METÓDY

ANTIGÉNY

Antigén z invázneho larválneho štádia *A. suum* (Uzl) sme pripravili deštruovaním lariev ultrazvukom (Borošková a i., 1974) po predchádzajúcej inkubácii vajčiek získaných z uteru samičiek podľa Costella (1961) a po odstránení vajecných obalov metódou Haskinsa a Weinsteina (1957).

Antigény z pohlavne zreých štádií *A. suum* sme pripravili delipidizáciou homogenizovaného extraktu z celých tiel helmintov (E) a bielkovinovú frakciu (F) sme získali z toho istého materiálu gelovou filtráciou na Sephadex G-200 (N a u -

myčevová, 1971). Z troch izolovaných frakcií sme používali ako antigén prvú frakciu.

SÉROLOGICKÁ REAKCIA

Nepriamy hemaglutinačný test podľa Boydena (1951) (IHA) sme robili Takátsyho mikrotitrátorom (Takátsy, 1958). Na taninizáciu baraních erytrocytov sme použili kyselinu tanínovú čs. výroby. Optimálne riedenie antigénov sme zistili boxovou titráciou.

ZVIERATÁ

Pokusy sme robili na 18 kusoch 21-dňových prasiat pochádzajúcich od prasníc, ktorých koprologické vyšetrenie na prítomnosť vajíčok *A. suum* bolo negatívne. Prasatá sme rozdelili do troch skupín (I. II., III.) po šiestich zvieratách. Kontrolou v každej skupine bolo jedno prasa. Modelový súbor kontrolných sér (Uhlíková, 1974) sme získali odberom krvi od 20 klinicky zdravých 7- až 14-dňových prasiat. Pred pokusom sme všetky zvieratá vyšetřili sérologicky (IHA) s použitím troch antigénov. Ani jedno zviera nedávalo pozitívnu sérologickú reakciu. Zvieratá sme invadovali perorálne jednorázovo sondou rôznymi dávkami inváznych vajíčok *A. suum* (I. skupina — 300 vajíčok na jedno prasa, II. skupina — 15 000 vajíčok na jedno prasa, III. skupina — 50 000 vajíčok na jedno prasa). Krv od invadovaných zvierat sme odoberali v piatom, šiestom, siedmom a ôsmom dni po invázii, ďalej v týždňových intervaloch a od 64. do 120. dňa po invázii v dvojtýždňových intervaloch. Helmintologickú pitvu zvierat sme z technických príčin nevykonali.

VÝSLEDKY

Pri použití Uzl anigénu sme prvé protilátky zaznamenali u druhej a tretej skupiny prasiat v šiestom dni a u prvej skupiny v siedmom dni po invázii.

Hodnoty titrov protilátok boli nízke (1:2). Protilátky u všetkých skupín zvierat dosahovali maximálne hodnoty medzi 21. až 29. dňom po invázii (1:64 — 1:1024). Potom hladina protilátok postupne klesala až k 64. dňu. Od toho dňa sme protilátky zisťovali u všetkých troch skupín zvierat iba v nízkych titrových hodnotách (1:4 — 1:2). Tieto hodnoty (1:2) pretrvávali až do konca ich sledovania, t. j. do 120. dňa po invázii. Výška titrov v jednotlivých obdobiach tvorby protilátok nebola priamo úmerná veľkosti inváznej dávky. Najvyššie hodnoty titrov protilátok (1:1024) sme zistili u skupiny prasiat invadovaných dávkou 3000 vajíčok na prasa.

Objavenie sa prvých protilátok pri použití antigénu z pohlavne zreých štádií (E) sme detekovali u tretej skupiny v siedmom dni a u prvej a druhej skupiny v ôsmom dni po invázii. V ďalších dňoch mala hladina protilátok u prvej a druhej skupiny vzostupnú tendenciu, s maximálnymi hodnotami v 29. dni po invázii. Od uvedeného dňa hladina protilátok postupne klesala až do 64. dňa (1:2). V ďalších dňoch už neboli protilátky detekovateľné. U tretej skupiny prasiat sa nám podarilo zistiť preukazné hodnoty titrov protilátok len od siedmeho do dvanásteho dňa po invázii.

Pri použití frakcionovaného antigénu (F) sme nástup protilátok zaznamenali medzi siedmym (III. skupina) a ôsmym dňom (I. a II. skupina) s vrcholom v 29. dni po invázii. V ďalších dňoch mala krivka protilátok paralelný priebeh ako v predchádzajúcom pokuse (s antigénom E) až po 64. deň (I. a II. skupina). Po tejto dobe sme protilátky

v sére nezasnamenali. U tretej skupiny sa nám podarilo dokázať protitátky od 7. do 21. dňa po invázii.

Antigény E a F v porovnaní s Uzl antigénom mali v celom priebehu sledovania invázneho procesu nižšiu sérologickú aktivitu v priemere o jeden až štyri hodnoty riedenia geometrického radu. V modelovom súbore kontrolných sér boli sérologické reakcie vo všetkých prípadoch negatívne.

Výsledky sme zhrnuli v tab. I.

1. Aritmetické priemery hodnôt titrov protitátok v nepriamom hemaglutinačnom teste u prasiat experimentálne invadovaných vajíčkami *Ascaris suum* — Arithmetical means of titre values of antibodies in an indirect haemagglutination test in pigs experimentally invaded by *Ascaris suum* eggs

Deň odberu krvi	Uzl			E			F		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
6	—	2,0	2,0	—	—	—	—	—	—
7	2,0	2,0	7,0	—	—	4,0	—	—	6,0
8	2,0	3,3	6,5	0,6	0,6	4,0	0,6	0,6	6,0
12	5,3	5,0	5,0	1,3	2,3	3,3	1,2	2,3	3,3
21	58,6	64,6	30,0	5,3	10,0	—	9,3	10,3	2,0
29	725,0	320,0	2,0	21,0	34,6	—	26,6	40,0	—
36	42,0	24,0	2,0	5,3	4,6	—	9,3	8,6	—
43	16,0	14,6	2,0	3,3	2,6	—	3,0	4,3	—
49	8,0	12,0	2,0	2,6	2,3	—	3,3	3,3	—
56	13,3	12,0	2,0	2,6	2,3	—	3,3	3,3	—
64	4,0	4,0	2,0	2,0	2,0	—	2,0	2,0	—
78	4,0	2,0	—	—	—	—	—	—	—
92	2,0	2,0	2,0	—	—	—	—	—	—
120	2,0	2,0	2,0	—	—	—	—	—	—

Uzl — antigén z invázneho larválneho štádia *A. suum*

E — extrakt z pohlavne zreých štádií *A. suum*

F — bielkovinová frakcia z pohlavne zreých štádií *A. suum*

I. skupina — 3000 vajíčok *A. suum* na jedno prasa

II. skupina — 15 000 vajíčok *A. suum* na jedno prasa

III. skupina — 50 000 vajíčok *A. suum* na jedno prasa

DISKUSIA

Porovnali sme sérologickú aktivitu troch typov antigénu z *A. suum* v reakcii nepriamej pasívnej hemaglutinácie pri dôkaze postinváznej migračnej fázy experimentálne invadovaných ošpaných. Antigén z druhého larválneho štádia (Uzl) sme získali rozbitím larválnych tiel ultrazvukom po predchádzajúcej inkubácii vajíčok *in vitro* a po zbavení vajecných obalov. Z pohlavne dospelých askaríd sme pripravili delipidizovaný extrakt (E), ktorý obsahuje mnoho balastných látok znižujúcich jeho antigénnu hodnotu (Kent, 1963). Materiál sme ďalej frakciono-

vali a purifikovali kolónovou chromatografiou na Sephadex (Naumyčevová, 1971). Naumyčevová (1971) hodnotí frakcionovaný antigén z *A. suum* v porovnaní s extraktom ako citlivejší a špecifickejší. I keď sa frakcionované antigény osvedčujú v experimentálnych prácach, v terénnej praxi je ich použitie obmedzené (Uhlíková, 1974).

Pri hodnotení našich výsledkov bol larválny antigén, v porovnaní s antigénmi z pohlavne zreých štádií, sérologicky aktívnejší v priemere o jednu až štyri hodnoty riedenia geometrického radu. Použitím uvedeného antigénu v IHA bola záchytnosť invázie u prasiat včasnšia ako s antigénmi z pohlavne zreých štádií o jeden až dva dni a protilátky boli detekovateľné od šiesteho až do 120. dňa po invázii, kým s E a F antigénmi doba zistenia protilátok v sére bola relatívne kratšia (do 64. dňa po invázii) — v závislosti od inváznej dávky. Vzhľadom na to, že za endogénnu migračnú fázu askaridózy ošípaných sú zodpovedné larvy, dá sa očakávať, že lepšie výsledky pri imunodiagnostike tohto ochorenia dajú antigény z larválneho štádia. Viens ai. (1975) tiež uvádzajú, že pri dôkaze migračnej fázy humánnej toxokarózy je larválny antigén v porovnaní s antigénmi pohlavne zreých štádií citlivejší a špecifickejší.

I keď sa pri experimentálnej invázii špecifického hostiteľa, teda v modelovom pokuse, pri sérologickom vyhodnotení troch typov antigénov jednoznačne osvedčil antigén z invázneho larválneho štádia *A. suum* (Uzl), domnievame sa, že u prirodzene invadovaných ošípaných, kde je častý výskyt zmiešanej invázie, budú pomery oveľa komplikovanejšie.

Literatúra

BOROŠKOVÁ, Z. — ČERMAN, J. — BENKOVÁ, M.: Isolation of somatic antigen from second stage larvae of *Ascaris suum*. Folia parasitol., Praha, 21, 1974, s. 329-331.

BOYDEN, S. V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent haemagglutination with antiprotein sera. J. exp. Med., 93, 1951, s. 107-121.

COSTELLO, L. C.: A simplified method of isolating *Ascaris* eggs. J. Parasitol., 47, 1961, s. 24.

HASKINS, W. T. — WEINSTEIN, P. P.: The amine constituents from excretory products of *Ascaris lumbricoides* and *Trichinella spiralis* larvae. J. Parasit., 43, 1957, s. 28-32.

KENT, N. H.: Fractionation, isolation and definition of antigens of parasitic helminths. Am. J. Hyg., Monogr. Series, 22, 1963, s. 30-45.

NAUMYČEVA, M. I.: Preparativnoje frakcionirovaniye antigenov iz gel'mintov. Trudy vses. Inst. Gel'mintol., 17, 1971, s. 259-262.

SOULSBY, E. J. L.: Immunity to helminths - recent advances. Vet. Rec., 72, 1960, s. 322-327.

TAKÁTSY, J.: Microtitrator Takátsy-OX-603/1 (Serological Microtitrator Aparatur). Laboratorium Felsterelések, Budapest 1958.

UHLÍKOVÁ, M.: Sérologické metody pro diagnostiku některých helmintóz. [Kandidátská disertace.] Praha 1974. — Institut pro další vzdělávání lékařů a farmaceutů.

VIENS, P. — STRYKOWSKI, H. — RICHARDS, R. — SONER, J.: A modified immunofluorescent antibody technique for the serodiagnosis of human toxocaral larva migrans. Canad. J. publ. Hlth., 66, 1975, s. 237-240.

Došlo dňa 31. 3. 1977

БОРОШКОВА, З. — БЕНКОВА, М. (Гельминтологический институт АН СССР, Кошице): Эффективность антигенов в разные стадии развития *Ascaris suum* при доказательстве миграционной фазы экспериментального аскаридоза у свиней. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 283-287.

Проверка эффективности антигенов, приготовленных из разных стадий развития *A. suum*, в косвенном гемагглютинационном тесте, при доказательстве миграционной фазы экспериментального аскаридоза свиней показала, что антиген, приготовленный с помощью ультразвука из инвазийной личиночной стадии *A. suum*, по сравнению с антигенами половозрелых стадий обладает большей серологической активностью. Посредством этого антигена можно доказать специфические антитела у экспериментально инвадированных свиней от 6-го до 120-го дней после инвазии в отличие от остальных испытанных антигенов (детектируемость антител между 7—8-м днями и до 64-го дня после инвазии).

Ascaris suum; антигены; серологическая активность; фазы миграции; свиньи

BOROŠKOVÁ, Z. — BENKOVÁ, M. (Helminthological Institute, Slovak Academy of Sciences, Košice): *The Efficiency of Antigens from Different Stages of Ascaris suum Development in the Proof of the Migration Phase of Experimental Ascariasis in Pigs*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 283-287.

Tests of the efficiency of antigens prepared from different developmental stages of *Ascaris suum* in indirect haemagglutination test in the course of proving the migration phase of experimental ascariasis in pigs show that the antigens prepared by ultrasound from the invasive larval stage of *A. suum* in comparison with antigens of sexually mature stages have higher serological activity. By using this antigen it is possible to prove specific antibodies in experimentally invaded pigs from 6 to 120 days after invasion as opposed to the other tested antigens (the detectability of antibodies from the 7th-8th day to the 64th day after invasion).

Ascaris suum; antigens; serological activity; migration phase; pigs

BOROŠKOVÁ, Z. — BENKOVÁ, M. (Helminthologisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Košice): *Die Effektivität der Antigene aus verschiedenen Entwicklungsstadien von Ascaris suum bei einem gleichzeitigen Nachweis der Migrationsphase der experimentalen Askarirose bei Schweinen*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 283-287.

Die Überprüfung der Effektivität der aus verschiedenen Entwicklungsstadien von *Ascaris suum* in einem indirekten Hämagglutinationstest vorbereiteten Antigene bei einem gleichzeitigen Nachweis der Migrationsphase der experimentalen Askarirose bei Schweinen zeigt, daß das Antigen, das durch Ultraschall aus dem Invasionslarvenstadium von *A. suum* vorbereitet ist, im Vergleich zu den aus geschlechtlich höheren Stadien gewonnenen Antigene eine erhöhte serologische Aktivität aufweist. Durch Ausnutzung von diesem Antigen können spezifische Antikörper bei experimentell angegriffenen Schweinen vom 6. bis 120. Tag nach der Invasion nachgewiesen werden ganz zum Unterschied von den anderen untersuchten Antigenen (Detektibilität der Antikörper im Zeitraum vom 7.—8. Tag bis zum 64. Tag nach der Invasion).

Ascaris suum; Antigene; serologische Aktivität; Migrationsphase; Schweine

Adresa autorov:

MVDr. Zora Borošková, CSc., MVDr. Magda Benková, Helminologický ústav SAV, Duklianských hrdinov 3, 040 00 Košice

Výběr z přírůstků
Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTIZ
z úseku veterinární medicína

Uvedené publikace je možné si vypůjčit 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.

CLAUSEN, B. — HENRIKSEN, S. A. D 30.900/593
The prevalence of *Trichinella spiralis* in foxes (*Vulpes vulpes*) and other game species in Denmark.

København, Statens veter. serumlab. 1976. 6 s. Meddelelser 593. (*Trichinella spiralis* — cizopasník — liška — výskyt — Dánsko — výzkum / *Trichinella spiralis* — cizopasník — lasicovití — výskyt — Dánsko — výzkum)

KONTRIMABIČUS, V. L. — DELJAMURE, S. L. — BOJEV, S. N. C 8.186/26

Metastrongiloidei domašních i dikých životných.

Moskva, Izd. Nauka 1976. 235 s. příl. obr. v textu. Osnovy nematodologii tom. 26. (Plícivkovití — cizopasníci — domácí zvířata a zvířata divoká — výzkum — SSSR)

KUBLICKE, O. D 66.546
Patomorfologija pečeni i vosstanovitel'nyje processy pri eksperimental'nom fascioleze.

Vilnius, Mokslas 1976. 156 s. 30 obr. 11 tab. (Motolice jaterní — cizopasník — játra — morfologie patogenní — vztahy — výzkum — SSSR)

LOOMIS, E. C. — HUGHES, J. P. — BRAMHALL, E. L. C 23.536/4006
The common parasites of horses.

Berkeley (California), Div. of agric. sciences 1975. 35 s. 60 obr. Sale publication 4006. (Cizopasníci — kůň — ochrana)

ENIGK, K. von D 60.119/128
Bekämpfung des Helminthen- und Ektoparasitenbefalles beim Geflügel. Zürich, Art. Inst. Orell Füssli 1972. 615-625 s. tab. Sndr. aus dem „Schweizer Archiv für Tierheilkunde“. (Drúbež — cizopasníci vnější — hubení — metody — výzkum / Drúbež — cizopasníci — červi — hubení — metody — výzkum — Švýcarsko)

CHUBENOV, M. — PRANDŽEV, I. D 66.297
Veterinarno skušestvo i ginekologija.

Sofija, Izd. za sel. lit. 1976. 468 s. 161 obr. 4 tab. (Veterinární porodnictví — příručka / Veterinární gynekologie — příručka)

IMUNOFLUORESCENCIA S VÍRUSOM PI-3 – ŠTÚDIUM ROZDIELNYCH PRACOVNÝCH PODMIENOK DETEKcie VÍRUSOVEJ INFEKcie IMUNOFLUORESCENCIou NA VIACERÝCH DRUHOCH BUNKOVÝCH KULTÚR

A. Žuffa, R. Chumchal

ŽUFFA, A. — CHUMCHAL, R. (Výskumné a vývojové pracovisko, Bioveta, Nitra): *Imunofluorescencia s vírusom PI-3 – štúdium rozdielnych pracovných podmienok detekcie vírusovej infekcie imunofluorescenciou na viacerých druhoch bunkových kultúr*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 289-304.

Fluorescentnú techniku sme použili pre štúdium citlivosti viacerých bunkových kultúr na infekciu vírusom parainfluenzy 3 (PI-3). Ako najcitlivejšie na vírusovú infekciu sa ukázali kultúry z telacích obličiek, pričom sa nezaznamenali rozdiely primárnych kultúr a kultúr v prvej a druhej subpasáži, resp. čerstvo napestovaných kultúr alebo kultúr inkubovaných počas siedmich dní pri teplote 37 °C. Rovnaké hodnoty infekčných titrov ako na kultúrach z telacích obličiek sme imunofluorescenciou zistili aj na jahňacích obličkových bunkách, aj keď prítomnosť infekcie nebola doprevádzaná vznikom cytopatických zmien. Na prasačích obličkových bunkách došlo k infekcii len pri očkovaní 10^5 TKID₅₀ a vyššími dávkami vírusu, pričom infekcia prebiehala veľmi pomaly a bez pozorovateľných cytopatických zmien. Fluorescentné nálezy boli na jednotlivých druhoch tkaniva rovnaké. Protilátky prítomné v kultivačnom médiu zabránili šíreniu infekcie neutralizovaním vírusu uvoľňovaného z buniek, nie však primárnej infekcii. Zvyšovanie obsahu protilátok v médiu viedlo – inhibovaním intercelulárneho vírusu – k spomaľovaniu rastu primárnych fluoreskujúcich ložísk.

vírus PI-3; imunofluorescencia; citlivosť rozdielnych tkanív; prenos infekcie; účinok protilátok

Časový dôkaz infekcie bunkovej kultúry vírusom PI-3 pomocou imunofluorescencie je závislý od multiplicity infekcie (Žuffa a Chumchal, 1977) a od druhu použitého tkaniva (Sominina ai., 1967) Van Der Maaten, 1969; Pospíšil ai., 1975), ktoré determinujú rýchlosť nástupu a priebeh vírusového množenia. Pri infekcii vnímavého tkaniva hraničnou dávkou vírusu je nástup špecifického žiarenia v porovnaní s veľkým inokulom oneskorený o 24 až 27 hodín (Žuffa a Chumchal, 1977). Van Der Maaten (1969) zaznamenal pri použití rovnakej infekčnej dávky skorší nástup vírusšpecifického žiarenia na kultúrach MDBK ako na sekundárnych telacích obličkových bunkách a Sominina ai. (1967) na bunkách stabilnej línie opičích obličiek ako na primárnych kultúrach psích obličiek. Rozdiely v časovom nástupe vírusovej fluorescencie sa zistili aj na orgánových kultúrach pripravených z rozdielnych častí dýchacieho traktu hovädzích foetov (Pospíšil ai. 1975).

Fluorescentná technika (FT) je osobitne vhodná pre štúdium vnímavosti rozdielnych tkanív na vírusovú infekciu. Umožňuje určiť iniciálne štádium vírusového množenia, sledovať priebeh infekcie bunkovej kultúry a identifikovať aj ojedinelé infikované bunky pri morfológicky neporušenej monovrstve buniek. Identifikovanie vírusovej infekcie imunofluorescenciou poskytuje tiež dobré pracovné podmienky pre štúdium účinku špecifických protilátok na priebeh infekcie v jednovrstvej kultúre buniek, a tým pre štúdium mikroepidemiologie vírusu.

Cieľom našej práce bolo definovať imunofluorescenciou citlivosť telacích obličkových a semenníkových buniek napestovaných v rozdielnych podmienkach, ako aj citlivosť kultúr z jahňacích a prasačích obličiek, na infekciu vírusom PI-3 a študovať účinok protilátok na priebeh vírusovej infekcie.

MATERIÁL A METÓDY

VÍRUSY

Pracovali sme s kmeňmi PI-3/T₁/25 a PI/T₆/3 v ôsmej, resp. v šiestej pasáži na kultúrach z telacích obličiek. Pôvod a charakteristika týchto kmeňov je uvedená v predchádzajúcom oznámení (Žuffa a i., 1977). Vírusy napestované na kultúrach primárnych telacích obličkových buniek (PTOB) v Rouxových fľašiach v médiu predstavujúcom Earlov roztok (ER) s 0,3 % LAH-u a 5 % fetálneho telacieho séra (FTS) sme po vyčistení odstredením rozplnili do ampuliek po 1 ml a až do použitia skladovali pri teplote -70 °C.

BUNKOVÉ KULTÚRY

Skúmavkové a skličkové kultúry PTOB a kultúry telacích a semenníkových buniek (PTSEB) primárne a v prvej a druhej subpasáži sme pripravovali rovnako, ako sme opísali (Žuffa a i., 1970). Kultúry jahňacích obličkových buniek (JOB) sme pripravovali z obličiek dvoj- až osemtyždňových jahniat a prasačie obličkové bunky (POB) z obličiek štvor- a šesťtyždňových prasiat. Rastové médium predstavoval Hanksov roztok s 0,3 % LAH-u a 10 % inaktivovaného telacieho séra, udržiavacie médium (UM) ER s 0,3 % LAH-u a 2 % FTS.

Infekciu bunkových kultúr sme robili rovnakým spôsobom, ako sme už uviedli (Žuffa a i., 1970). Počet skličok, veľkosť inokula a trvanie inkubácie infikovaných kultúr uvádzame pri opise jednotlivých pokusov.

Pri štúdiu účinku protilátok na priebeh infekcie v monovrstve buniek sme postupovali takto: Skličkové kultúry PTOB sme po infekcii opláklí a prevrstvili 2 ml UM s obsahom protilátok alebo bez protilátok. Ako zdroj protilátok slúžilo imúnne hovädzie sérum, ktoré 10² TKID₅₀ neutralizovalo v riedení 1 : 2048. V rozličnom čase od infekcie, ako uvádzame pri opise jednotlivých pokusov, sme kultúry farbili konjugovaným imoglobulínom a vyšetrili mikroskopicky.

IMUNOFLUORESCENCIA

Pracovali sme len priamou metódou. Pre farbenie infikovaných kultúr sme použili jednu šaržu konjugátu, pripravenú z imúnneho telacieho séra, s pracovným riedením 1 : 16 (Žuffa a i., 1977). Farebné kultúry sme vyšetrili mikroskopom FLUOVAL fy Zeiss (filtre G 247 a B 224, objektív 6,3 a 16, okulár 6,3). Fluoreskujúce ložiská sme počítali spôsobom bežne zaužívaným v našom laboratóriu (Žuffa a i., 1970, 1976).

VÝSLEDKY

ÚČINOK ROZDIELNYCH SPÔSOBOV FIXÁCIE KULTÚR NA FLUORESCENTNÉ NÁLEZY

Dostatočný počet skličkových kultúr PTOB, infikovaných kmeňom PI-3/T₁/25 v dávkach 10¹ a 10⁵ TKID₅₀, sme po 24 a 48 h inkubácie pri

teplote 37 °C vysušili pri laboratórnej teplote a farbili bez fixovania, resp. fixovali nevychladeným acetómom 10 min. pri laboratórnej teplote, nevychladeným acetómom 20 min. pri teplote -20 °C a konečne acetómom vychladeným na -20 °C 20 min. pri teplote -20 °C. Nezaznamenali sme rozdiely v intenzite ani v charaktere vírusšpecifického žiarenia na kultúrach nefixovaných a fixovaných acetómom za rozdielnych podmienok (tab. I).

I. Účinok rozdielnych spôsobov fixovania kultúr PTOB infikovaných vírusom PI-3 na intenzitu špecifickej fluorescence — The effect of different ways of fixing PTOB cultures infected with PI-3 virus on the intensity of specific fluorescence

Spôsob fixovania kultúr	Dávka vírusu v TKID ₅₀	Intenzita žiarenia pri farbení kultúr za dní p. i.	
		1	2
Vysušenie pri laboratórnej teplote	10 ¹	1 0/—	2 10/+++
	10 ³	10/+++	50/+++
Acetón nechladený 10 min. pri laboratórnej teplote	10 ¹	3 OFB/+++	20/+++
	10 ³	10/+++	60/+++
Acetón nechladený 20 min. pri -20 °C	10 ¹	OFB/+++	15/+++
	10 ³	10/+++	60/+++
Acetón chladený na -20 °C 20 min. pri -20 °C	10 ¹	OFB/+++	15/+++
	10 ³	10/+++	60/+++

1 — % žiariacich buniek

2 — intenzita žiarenia

3 — OFB — ojedinelé žiariace bunky

VPLYV PASÁŽOVANIA A VEKU KULTÚR PTOB NA VÍRUSOVÚ INFEKCIU

Pre účely titrácie vírusu PI-3 aj pre imunofluorescentné štúdie sme pravidelne používali dvojdnové kultúry PTOB v druhej subpasáži. Pri titráciách vírusu PI-3 na primárnych kultúrach aj na kultúrach v subpasáži, ale starších ako dva dni, sme zaznamenali oneskorený nástup CPE a nižšie titry vírusu (v porovnaní s dvojdnovými kultúrami). Chceli sme preto zistiť, či stárnutím buniek neklesá ich vnímavosť na vírusovú infekciu. Za tým účelom sme pripravili dostatočný počet sklíčkových kultúr, ktoré sme postupne, počnúc od druhého až do siedmeho dňa od naloženia, infikovali log₁₀ riedeniami dvoch kmeňov vírusu PI-3. Infikované kultúry sme fixovali a farbili za tri dni p. i. Z výsledkov shrnutých v tab. II je zrejmé, že citlivosť buniek PTOB v druhej subpasáži ostáva na infekciu vírusom PI-3 do siedmeho dňa inkubácie nezmenená.

V ďalších pokusoch sme paralelne infikovali log₁₀ riedeniami dvoch

II. Vplyv veku kultúr PTOB v druhej subpasáži na citlivosť pre infekciu vírusom PI-3 — The effect of the age of PTOB cultures in the second subpassage on the susceptibility to infection with PI-3 virus

Kmeň vírusu	Vek kultúr v dňoch	Titer vírusu v TKID ₅₀ zistený FT
PI-3/T ₁ /25	2	10 ^{6,5}
	3	10 ^{6,3}
	4	10 ^{6,5}
	5	10 ^{6,5}
	6	10 ^{6,5}
	7	10 ^{6,0}
	7	10 ^{6,0}
PI-3/T ₆ /3	2	10 ^{6,6}
	3	10 ^{7,0}
	4	10 ^{6,5}
	5	10 ^{6,6}
	6	10 ^{6,6}
	7	10 ^{6,5}
	7	10 ^{6,5}

III. Citlivosť primárnych kultúr PTOB na infekciu vírusom PI-3 v porovnaní s kultúrami v prvej a druhej subpasáži — Susceptibility of primary PTOB cultures to PI-3 virus infection compared with cultures in the first and second subpassages

Kmeň vírusu	Kultúry	Titer vírusu v TKID ₅₀ /0,2 ml zistený FT
PI-3/T ₁ /25	primárne	10 ^{6,3}
	v prvej subpasáži	10 ^{6,5}
	v druhej subpasáži	10 ^{6,3}
PI-3/T ₆ /3	primárne	10 ^{6,5}
	v prvej subpasáži	10 ^{6,6}
	v druhej subpasáži	10 ^{6,6}

kmeňov vírusu PI-3 sklíčkové a skúmavkové kultúry z teľacích obličiek, a to primárne a v prvej a druhej subpasáži. Prítomnosť infekcie sme na sklíčkových kultúrach zisťovali imuno fluorescenciou po trojdňovej inkubácii a na skúmavkových kultúrach podľa CPE v siedmom dni *p. i.* Výsledky sú zhrnuté v tab. III. Vidieť, že napriek rozdielnemu vývoju cytopatických zmien sú primárne kultúry PTOB na infekciu vírusom PI-3 rovnako citlivé ako kultúry v prvej a druhej subpasáži.

CITLIVOSŤ VIACERÝCH DRUHOV BUNKOVÝCH KULTÚR NA VÍRUSOVÚ INFEKCIU

Pri štúdiu citlivosti bunkových kultúr z teľacích semenníkov na infekciu vírusom PI-3 sme očkovali sklíčkové kultúry PTOB a PTSEB simultánne veľkým inokulom a log₁₀ riedeniami vírusu a zisťovali sme časový nástup fluorescencie, rýchlosť šírenia infekcie v kultúre a charakter a intenzitu žiarenia v jednotlivých bunkách. Na kultúrach PTOB sme zisťovali, bez ohľadu na multiplicitu infekcie, pozitívne fluorescentné nálezy skôr, pričom pri použití malých dávok vírusu sa infekcia šírila rýchlejšie a ku generalizovanej infekcii došlo skôr ako na se-

IV. Porovnanie citlivosti kultúr primárnych telacích obličkových buniek a telacích semenníkových buniek na infekciu vírusom PI-3 — Comparison of susceptibility of cultures of primary calf kidney cells and calf testicle cells to PI-3 virus infection

Kmeň vírusu	Kultúry	Riedenie vírusu	Fluorescentné nálezy na kultúrach a h ... od infekcie								Titer vírusu
			16		20		30		48		
PI-3/T ₁ /25	PTOB	10 ⁻⁴	OFB OFB	OFB OFB	LFB LFB	OFB LFB	FCM FCM	FCM FCM	N		10 ^{6,6}
		10 ⁻⁵	—	—	OFB OFB	OFB OFB	SLFB LFB	SLFB SLFB	FCM SLFB	FCM FCM	
		10 ⁻⁶	—	—	—	—	OFB OFB	OFB OFB	FCM FCM	FCM FCM	
		10 ⁻⁷	N		—	—	—	—	OFB	—	
	PTSEB	10 ⁻⁴	—	—	—	OFB	LFB OFB	OFB LFB	FCM SLFB	LFB LFB	10 ^{5,6}
		10 ⁻⁵	—	—	—	—	OFB OFB	OFB OFB	FCM LFB	SLFB LFB	
		10 ⁻⁶	—	—	—	—	—	—	—	OFB	
		10 ⁻⁷	N		N		—	—	—	—	
PI-3/T ₆ /3	PTOB	10 ⁻⁴	OFB OFB	OFB OFB	OFB OFB	LFB OFB	FCM FCM	FCM FCM	FCM FCM	FCM FCM	10 ^{7,0}
		10 ⁻⁵	—	—	—	OFB	LFB OFB	LFB LFB	FCM FCM	FCM FCM	
		10 ⁻⁶	—	—	—	—	OFB OFB	OFB OFB	FCM FCM	LFB FCM	
		10 ⁻⁷	—	—	—	—	OFB	—	OFB	OFB	
	PTSEB	10 ⁻⁴	—	—	OFB OFB	OFB OFB	SLFB LFB	LFB LFB	FCM FCM	FCM FCM	10 ^{6,3}
		10 ⁻⁵	—	—	—	—	LFB LFB	LFB LFB	LFB LFB	FCM SLFB	
		10 ⁻⁶	N		—	—	—	OFB	LFB	LFB OFB	
		10 ⁻⁷	N		N		—	—	—	—	

OFB = ojedinelé fluoreskujúce bunky;
LFB = ložiská fluoreskujúcich buniek;

SLFB = splývajúce ložiská fluoreskujúcich buniek

V. Paralelná titrácia vírusu PI-3 na kultúrach primárnych teľacích obličkových buniek, jahňacích a prasačích obličkových buniek podľa cytopatických zmien a pomocou imunofluorescencie - Parallel titration of PI-3 virus on cultures of primary calf kidney cells, lamb and pig kidney cells with cytopathic changes by immunofluorescence

Kmeň	Pokus číslo	Druh tkaniva	Fluorescentné nálezy pri riedeniach vírusu								Titer vírusu v TKID ₅₀ podl'a		
			10 ⁻¹		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		FT	CPE	
PI-3/T ₁ /25	1	PTOB	N		FCM	FCM	FCM	LFB	OFB	OFB	10 ^{7,0}	10 ^{6,5}	
		JOB	FCM	FCM	FCM	FCM	SLFB	SLFB	—	OFB	10 ^{6,6}	10 ^{2,0}	
		POB	LFB	LFB	OFB	—	—	—	—	—	10 ^{5,0}	10 ^{2,0}	
	2	PTOB	N		FCM	FCM	SLFB	LFB	OFB	—	10 ^{7,0}	10 ^{6,3}	
		JOB	N		FCM	FCM	SLFB	LFB	OFB	—	10 ^{7,0}	10 ^{2,0}	
		POB	LFB	LFB	OFB	—	—	—	—	—	10 ^{5,3}	10 ^{2,0}	
	PI-3/T ₆ /3	1	PTOB	N		FCM	FCM	SLFB	SLFB	—	OFB	10 ^{6,6}	10 ^{6,0}
			JOB	N		SLFB	SLFB	LFB	SLFB	—	—	10 ^{6,5}	10 ^{2,0}
			POB	OFB	LFB	—	OFB	—	—	—	—	10 ^{4,6}	10 ^{2,0}
2		PTOB	N		FCM	FCM	FCM	SLFB	OFB	—	10 ^{7,3}	10 ^{6,6}	
		JOB	N		FCM	FCM	SLFB	LFB	—	OFB	10 ^{7,0}	10 ^{2,0}	
			OFB	LFB	—	OFB	—	—	—	—	10 ^{4,6}	10 ^{2,0}	

menčíkových kultúrach. Očkovaní semenníkových kultúr hraničnými dávkami vírusu nenavodilo replikáciu vírusu, a preto sme na nich zistili nižšie hodnoty infekčných titrov ako na kultúrach PTOB (tab. IV). V počiatočnom štádiu infekcie bolo vírusšpecifické žiarenie intenzívnejšie na obličkových ako na semenníkových kultúrach, kým v ďalšom priebehu boli celkové fluorescentné nálezy na obidvoch druhoch tkaniva rovnaké. Zistené nálezy svedčia o tom, že tefacie semenníkové bunky sú na infekciu vírusom PI-3 menej citlivé ako kultúry z tefacích obličiek.

Pre štúdium vnímavosti bunkových kultúr z jahňacích a prasačích obličiek na vírusovú infekciu sme volili metódu opakovaných paralelných titrácií na skúmavkových a sklíčkových kultúrach uvedených druhov tkanív v porovnaní s infekčnými titrami zistenými na kultúrach PTOB. Výsledky sú zhrnuté v tab. V. Pri hodnotách infekčných titrov okolo $10^{6.5}$ TKID₅₀, zistených na kultúrach tefacích obličiek podľa CPE, sme na skúmavkových kultúrach JOB a POB nezistili žiadne cytopatické zmeny ani pri očkovaní dávkou 10^4 TKID₅₀ vírusu. Na sklíčkových kultúrach sme imunofluorescenciou zistili rovnaké infekčné titry na tefacích a jahňacích obličkových kultúrach, kým na kultúrach z prasačích obličiek sa vírusová fluorescencia dokázala len pri infekcii dávkou 10^3 TKID₅₀ vírusu. Aj šírenie vírusovej infekcie bolo na prasačích obličkových kultúrach veľmi pomalé. Na sklíčkach infikovaných 10^3 TKID₅₀ vírusu sme aj po trojdňovej inkubácii zisťovali len ohraničené fluoreskujúce ložiská. Charakter fluorescencie bol na obidvoch druhoch tkaniva rovnaký ako na kultúrach PTOB, len intenzita žiarenia bola o niečo slabšia. Získané nálezy svedčia pre preukazne nižšiu vnímavosť prasa-

VI. Účinok protilátok v udržiavacom médiu na tvorbu primárnych fluoreskujúcich ložísk a na lokalizáciu infekcie — The effect of antibodies in the maintenance medium on the formation of primary fluorescent lesion and on the localization of infection

Kultúry farbené za h od p. i.	Pokus 1		Pokus 2	
	IHS+	FTS++	IHS	FTS
16	2,3/ 1— 2+++	10 /1— 6	21,7/1— 2	33/1— 15
18	6,3/ 1— 2	9 /2— 10	35,0/1— 2	50/2— 30++++
20	4,0/ 1— 2	9 /2— 10	36,6/1— 2	50/5— 50
24	9,0/ 1— 2	10,3/5— 50	38,0/1— 5	SLFB
30	6,5/ 1— 10	RI	48,3/1— 10	FCM
48	9,0/ 2— 20	FCM	55,0/5— 20	FCM
72	8,0/10— 30	FCM	53,0/5— 30	FCM

+ = kultúry zaliaté médiom s obsahom 5 % IHS

++ = kultúry zaliaté médiom s obsahom 5 % FTS

+++ = priemerné počty fluoreskujúcich ložísk zistené na štyroch sklíčkových kultúrach PTOB/
počet žiariacich buniek v rámci jedného ložiska

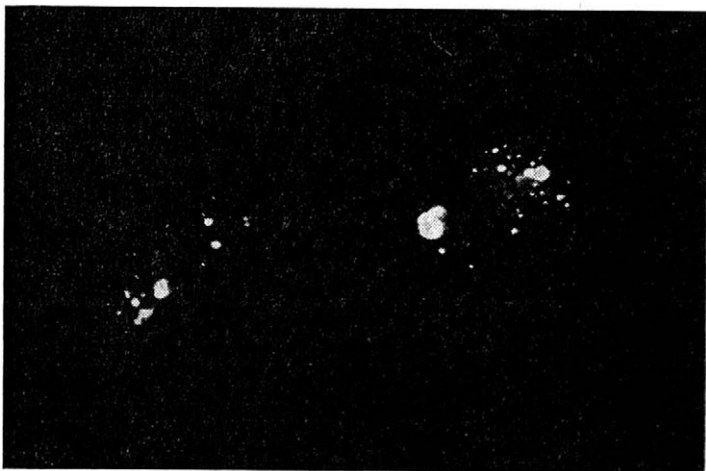
++++ = popri zhlukoch buniek s pokročilou infekciou solitárne fluoreskujúce bunky

čích obličkových buniek na infekciu kmeňmi, s ktorými sme pracovali, v porovnaní s teľacími a jahňacími obličkovými bunkami.

ÚČINOK PROTILÁTOK V UM NA PRIEBEH VÍRUSOVEJ INFEKČIE V MONOVRSTVE BUNIEK

V prvom pokuse tejto série sme zisťovali rýchlosť rozsevu infekcie cestou kultivačného média a inhibičný účinok protilátok prítomných v UM na vývoj primárnej infekcie a na intercelulárny prenos vírusu. Sklíčkové kultúry PTOB, infikované dávkami okolo 10 a 50 PFU vírusu, sme zaliali médiom bez IHS a s obsahom 5 % IHS a farbili po rozlične dlhej inkubácii. Na ofarbených kultúrach sme zisťovali počet infekčných ložísk a počet fluoreskujúcich buniek v rámci jednotlivých ložísk. Výsledky jedného z reprezentatívnych pokusov sú uvedené v tab. VI.

Na kultúrach zaliatych médiom bez protilátok, infikovaných dávkou ca 10 PFU vírusu, sme zistili rovnaký počet primárnych fluoreskujúcich plakov do 24 hodín, s postupným narastaním počtu žiariacich buniek v rámci jednotlivých ložísk; po tomto čase došlo k disseminovaniu vírusu a generalizovanej infekcii bunkovej kultúry. Na kultúrach infiko-

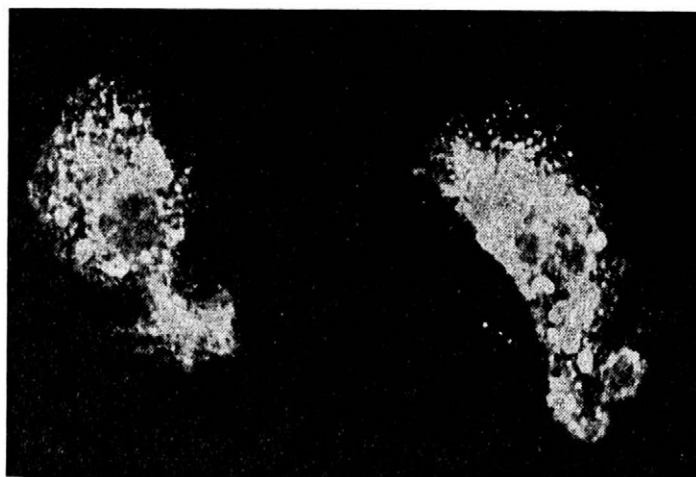


1. Kultúra PTOB infikovaná dávkou 10^5 TKID₅₀ vírusu PI-3/T₁/25, zaliatá médiom s obsahom 1,25 % IHS, farbená za 24 hodín *p. i.*, samostatne žiariace bunky — PTOB culture infected with a dose of 10^5 TKID₅₀ of PI-3/T₁/25 virus, poured by a medium containing 1.25 % IHS, stained after 24 hours *p. i.*, independent fluorescent cells

2. Granulárna fluorescencia v cytoplazme buniek za 24 hodín *p. i.* — Granular fluorescence in the cytoplasm of cells after 24 hours *p. i.*



3. Akumulácia fluoreskujúceho antigénu v bunkách za 48 hodín *p. i.* — Accumulation of fluorescent antigen in cells after 48 hours *p. i.*



vaných ca 50 PFU vírusu došlo k rozsevu infekcie už za 18 hodín, pričom za 24 hodiny sa zistila generalizovaná infekcia bunkovej kultúry.

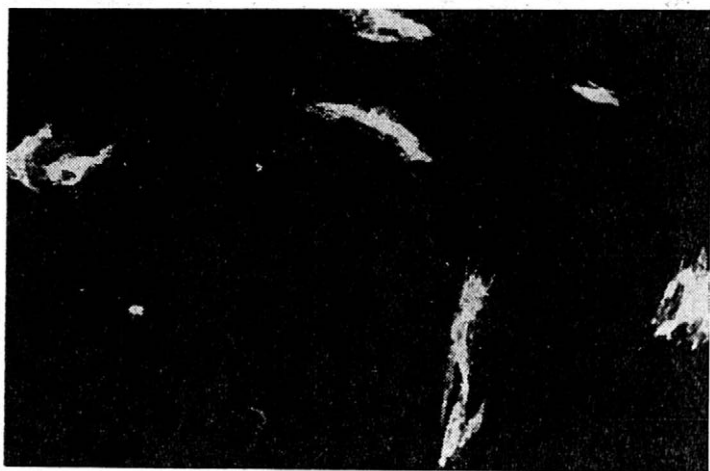
Na kultúrach zaliatych médiom s 5 % IHS sa za 16 hodín *p. i.* objavili solitárne alebo dve vedľa seba uložené fluoreskujúce bunky (obr. 1, 2). Predĺžením inkubácie sa akumulovanie vírusových antigénov v bunkách prejavilo narastaním a splývaním intenzívne žiariacich granúl (obr. 3). Počet fluoreskujúcich ložísk ostal rovnaký až do 72. hodiny *p. i.* Fluoreskujúce ložiská predstavovali do 24. hodiny jednotlivé, alebo dve

VII. Účinok rozličného obsahu protilátok v udržiavacom médiu na počet a veľkosť fluoreskujúcich plakov — The effect of different contents of antibodies in the maintenance medium on the number and size of fluorescent lesions

Obsah IHS v UM v %	Priemerný počet plakov na skľikových kultúrach za h od <i>p. i.</i>		
	24	48	72
0,0000	FCM	FCM	N
0,0019	58 /1—15	73,0/10—100	47,2/25—100
0,0390	70 /1—10	81,5/10—60	64,3/20—100
0,0780	73,2/1—8	76,5/10—60	86,0/20—80
0,1560	67,6/1—8	76,2/10—50	61,0/20—80
0,3120	71,8/1—8	83,3/5—30	61,8/10—80
0,6250	65,5/1—8	77,0/5—25	55,3/3—70
1,2500	74,7/1—5	74,3/2—25	62,0/5—50
2,5000	64,5/1—5	79,0/2—15	64,0/5—60
5,0000	69,0/1—5	75,2/2—15	67,0/5—50

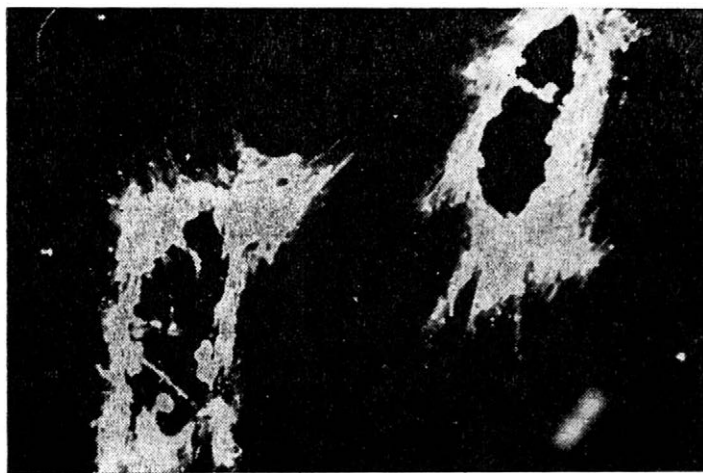
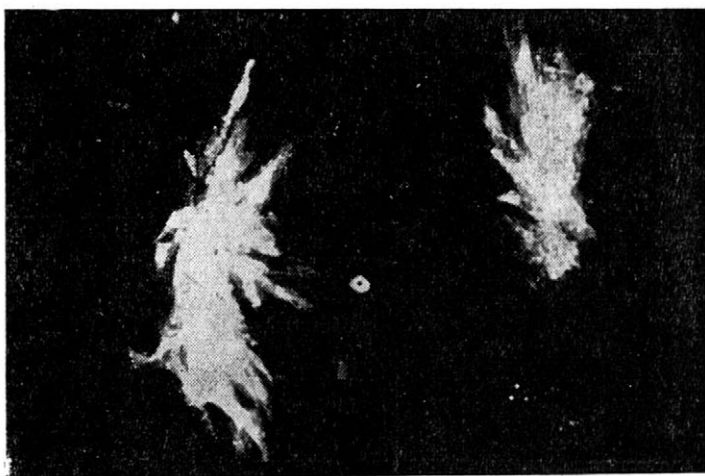
vedľa seba uložené bunky, potom počet žiariacich buniek v rámci jednotlivých plakov narastal a do 72. hodiny stúpol ca desaťnásobne.

Za účelom dôkaznejšieho štúdia účinku protilátok omývajúcich infikované bunky na tvorbu, počet a veľkosť fluoreskujúcich plakov sme



4. Fluoreskujúce plaký za 48 hodín p. i. — Fluorescent lesions after 48 hours p. i.

5. Fluoreskujúce plaký za 72 hodín p. i. — Fluorescent lesions after 72 hours p. i.



6. Vytváranie prázdnych ôk v strede plakov odumieraním a odlupovaním prvotne infikovaných buniek za 96 hodín p. i. — Formation of holes in the centre of lesions by the dying and peeling off of primarily infected cells after 96 hours p. i.

VIII. Účinnok rozličného obsahu protilátok v udržiavacom médiu na titre vírusu (stanovené imunofluorescenciou) — The effect of different contents of antibodies in the maintenance medium on the virus titres determined by immunofluorescence

Kmeň vírusu	Obsah IHS v UM v %	Fluorescentné nálezy pri riedeniach vírusu						Titer vírusu
		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		
PI-3/T ₁ /25	0,0000	FCM FCM FCM FCM	FCM FCM FCM FCM	FCM FCM FCM FCM	FCM FCM FCM FCM	FCM FCM FCM FCM	FCM FCM FCM FCM	10 ^{7,5}
	0,0019	SLFB SLFB LFB SLFB	SLFB SLFB LFB SLFB	10 7 5 4	10 7 5 4	1 1 1 1	1 1 1 1	10 ^{7,0}
	0,0390	SLFB SLFB SLFB SLFB	SLFB SLFB SLFB SLFB	4 3 3 6	4 3 3 6	— — — —	— — — —	10 ^{6,5}
	0,0780	LFB LFB LFB LFB	LFB LFB LFB LFB	5 8 6 3	5 8 6 3	— — — —	— — — —	10 ^{6,5}
	0,1560	55 ⁺ 60 57 50	55 ⁺ 60 57 50	6 10 6 8	6 10 6 8	2 1 — —	2 1 — —	10 ^{7,0}
	0,3120	38 45 47 49	38 45 47 49	9 10 8 4	9 10 8 4	— 1 — 1	— 1 — 1	10 ^{7,0}
	0,6250	63 48 50 45	63 48 50 45	2 3 4 6	2 3 4 6	1 — — —	1 — — —	10 ^{6,6}
	1,2500	60 54 40 60	60 54 40 60	6 4 5 7	6 4 5 7	— 1 — —	— 1 — —	10 ^{6,6}
PI-3/T ₆ /3	0,0000	FCM FCM FCM FCM	FCM FCM FCM FCM	LFB LFB LFB LFB	LFB LFB LFB LFB	LFB — LFB LFB	LFB — LFB LFB	10 ^{7,3}
	0,0019	44 25 35 23	44 25 35 23	— 2 1 4	— 2 1 4	— — — —	— — — —	10 ^{6,3}
	0,0390	44 41 51 38	44 41 51 38	4 2 3 1	4 2 3 1	— — — —	— — — —	10 ^{6,5}
	0,0780	31 28 28 32	31 28 28 32	2 1 — 4	2 1 — 4	— — — —	— — — —	10 ^{6,3}
	0,1560	45 58 38 39	45 58 38 39	4 3 7 —	4 3 7 —	1 — — —	1 — — —	10 ^{6,5}
	0,3120	24 41 32 36	24 41 32 36	2 6 — 3	2 6 — 3	— — — —	— — — —	10 ^{6,3}
	0,6250	30 44 25 33	30 44 25 33	5 5 1 7	5 5 1 7	1 — — —	1 — — —	10 ^{6,6}
	1,2500	45 32 25 45	45 32 25 45	— 3 2 5	— 3 2 5	— — — —	— — — —	10 ^{6,3}

+ Počet fluoreskujúcich ložísk

zalievali kultúry infikované dávkami okolo 50 infekčných jednotiek vírusu médiom s rozličným obsahom protilátok (5 % IHS a menej). Kultúry s médiom bez imúneho séra sme farbili za 24 hodín, ostatné za 24, 48 a 72 hodín *p. i.*

Na kultúrach zaliatych médiom bez protilátok došlo už za 24 hodín k rozsevu infekcie a vývoju sekundárnych fluoreskujúcich ložísk. Aj pomerne malé množstvo protilátok zabránilo rozsevu infekcie, pričom aj najvyšší obsah IHS v UM neovplyvnil počet fluoreskujúcich ložísk. Vyšší obsah protilátok v médiu však inhiboval intercelulárny prenos infekcie, čoho prejavom bol menší počet žiariacich buniek v rámci jednotlivých ložísk (tab. VII).

Jednotlivé fluoreskujúce ložiská majú pretiahly tvar (obr. 4) a predĺžením inkubácie dochádza k narastaniu ich veľkosti (obr. 5) a vzájomnému splývaniu. Za 72 hodiny od infekcie vedie odumieranie a odlupovanie primárne infikovaných buniek k tvorbe prázdnych centier, ktoré sú ohraničené širokým pruhom husto vedľa seba uložených intenzívne fluoreskujúcich buniek (obr. 6).

Pri ďalšom štúdiu účinku protilátok na vývoj primárnej infekcie sme očkovali dostatočný počet sklíčkových kultúr PTOB log₁₀ riedeniami vírusu a v skupinách zalievali médiom s rozličným obsahom IHS (0,019—1,25 %); jedna skupina kultúr bola vždy zaliata médiom bez protilátok. Všetky infikované kultúry sme farbili po trojdňovej inkubácii pri teplote 37 °C. Výsledky sú zahrnuté v tab. VIII. Nezistili sme, v súlade s výsledkami predchádzajúcich pokusov, rozdiely v počte fluoreskujúcich ložísk na kultúrach zaliatych médiom s rozličným obsahom protilátok. Infekčné titry vírusu boli však vyššie na kultúrach zaliatych médiom bez protilátok, ako na kultúrach v médiu s rozličným obsahom imúneho séra. Príčinou toho je najskôr neutralizovanie vírusových častíc, ktoré po väzbe na bunkové receptory boli ešte zasažiteľné špecifickou protilátkou.

IX. Účinok protilátok na počet fluoreskujúcich plakov pridaných do udržiavaceho média za rozličný čas od infekcie sklíčkových kultúr — The effect of antibodies on the numbers of fluorescent lesions added to the maintenance medium after different periods of time after infection of glass cultures

Pokus číslo	Počet plakov v 0,2 ml na kultúrach					UM bez protilátok
	UM nahradené za médium s 2,5 % IHS za h . . . p. i.					
	0	4	6	8	10	
1	3×10^6	6×10^7	$7,3 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$	9×10^7	$10^{7,3}$ TKID ₅₀
2	8×10^5	$6,5 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$	$10^{6,5}$ TKID ₅₀

Za účelom potvrdenia tohoto predpokladu sme dostatočný počet sklíčkových kultúr infikovaných log₁₀ riedeniami vírusu zaliali UM bez protilátok, ktoré sme následne po štyroch, šiestich, ôsmich a desiatich hodinách inkubácie vymieňali za médium s obsahom 2,5 % IHS; jedna skupina kultúr ostala zaliata médiom bez protilátok. Z výsledkov zhrnutých v tab. IX vidieť, že ak dôjde k prísunu protilátok do média za

6 hodín *p. i.*, t. j. v čase, kedy už nie je vírus viazaný na bunky zasá-
žiteľný protilátkami, zisťujú sa na sklíčkových kultúrach PTOB imu-
nofluorescenciou rovnaké titry vírusu ako na kultúrach bez protilátok.

DISKUSIA

Vírus PI-3 vykazuje dobré rastové vlastnosti na širokom spektre bunkových kultúr (Kita a Gillespie, 1968; Luczak a Korbecki, 1970), čo poskytuje dobré podmienky pre experimentálnu a diagnostickú prácu s týmto vírusom. Množenie vírusu PI-3 v bunkovej kultúre je spravidla doprevádzané vývojom cytopatických zmien, môže však prebiehať, v závislosti od vlastností kmeňa (Dinter *ai.*, 1960) aj druhu tkaniva (Kita a Gillespie, 1968), bez zjavného poškodenia buniek. V našich pokusoch sme pre štúdium citlivosti viacerých druhov bunkových kultúr na infekciu vírusom PI-3 použili fluorescentnú techniku, ktorá dovoľuje odkryť prítomnosť a sledovať priebeh infekcie aj pri absencii pozorovateľných cytopatických zmien. Z testovaných druhov tkanív sa ako najcitlivejšie na vírusovú infekciu ukázali kultúry z telacích obličiek, a to bez ohľadu na to, či išlo o kultúry primárne, v prvej alebo druhej subpasáži, resp. o kultúry použité na infekciu ihneď po vytvorení monolayera alebo až po sedemdnovej inkubácii. Pri infekcii bunkových kultúr malými dávkami vírusu však prítomnosť vírusovej infekcie, dokazovanej FT, nedoprevádzal vývoj morfológických zmien na bunkách, preto aj titry zisťované imunofluorescenciou boli vo všetkých prípadoch vyššie ako podľa CPE. Kultúry z telacích semenníkov sa ukázali v porovnaní s kultúrami PTOB na infekciu ako menej citlivé, čo sa prejavilo neskorším nástupom vírusšpecifického žiarenia, pomalším šírením infekcie v rámci kultúry, ako aj absenciou fluorescencie na sklíčkach očkovaných hraničnými dávkami vírusu. Pospíšil *ai.* (1975) zistili rozdielny časový nástup vírusovej fluorescencie na orgánových kultúrach pripravených z rôznych častí hovädzích fétov, a tým nepriamo dokázali ich rozdielnu vnímavosť na infekciu vírusom PI-3; na orgánových kultúrach z priedušnice a nosa sa dokázala fluorescencia za dva dni *p. i.*, kým na kultúrach pľúc až za štyri dni *p. i.* Pomalé šírenie infekcie vírusu PI-3 na kultúrach z hovädzej trachey zaznamenal aj Van Der Maaten (1969), keď po ofarbení špecifickým konjugátom za 120 hodín *p. i.* žiarila menej ako polovica buniek monolayera.

V našich pokusoch sme na kultúrach z jahňacích obličiek zistili imunofluorescenciou rovnaké titry vírusu ako na kultúrach PTOB, aj keď priebeh infekcie nebol doprevádzaný vývojom zjavných cytopatických zmien. Naproti tomu vyvolalo množenie vírusu na prasačích obličkových bunkách len použitie väčšej dávky vírusu, šírenie infekcie v rámci kultúry bolo veľmi pomalé a bez zistiteľného poškodenia buniek. Aj Sominina *ai.* (1967) zaznamenali pri infekcii bunkovej kultúry stabilnej línie z opičej obličky vírusom PI-3 ešte za štyri až päť dní *p. i.* bunky prosté akejkolvek vírusovej fluorescencie.

Fluorescentné nálezy boli v jednotlivých štádiách infekcie rovnaké na všetkých druhoch tkaniva.

Spôsob šírenia vírusovej infekcie v bunkovej kultúre je u jednotlivých vírusov rozdielny. Aj keď sa pri väčšine vírusov považuje za hlavný

prenos infekcie cez kultivačné médium, primárne je intracelulárne šírenie, na ktoré v rozličnom časovom odstupe nadväzuje extracelulárny prenos vírusu. Pri štúdiu spôsobu šírenia vírusovej infekcie v bunkovej kultúre sa extracelulárnemu prenosu infekcie zabráni pridaním imúnneho séra do UM (Black a Melnick, 1955; Wheeler, 1960; Hahnefeld ai., 1965) a priebeh infekcie na úrovni bunky a tkanivovej kultúry sa zisťuje imunofluorescenciou (Mengeling, 1968; Mohanty a Cottral, 1970; Žuffa ai., 1976). Fluorescentné nálezy na kultúrach PTOB infikovaných definovanými dávkami vírusu PI-3, zaliatych médiami bez protilátok a s obsahom imúnneho séra ukázali, že špecifické protilátky neovplyvnili vznik a ďalší vývoj primárnej infekcie. Pokračujúca akumulácia fluoreskujúceho antigénu v cytoplazme primárne infikovaných buniek, pri intercelulárnom prenose na priľahlé bunky, svedčí o dlhodobšej produkcii vírusu v jednotlivých bunkách. Aj veľmi malé množstvo protilátok v UM zabránilo prenosu infekcie cez kultivačné médium a vývoju sekundárnych fluoreskujúcich ložísk, pričom stúpajúci obsah protilátok sa prejavil spomalením rastu primárnych fluoreskujúcich ložísk. Uvedené nálezy svedčia o tom, že protilátky omývajúce bunkovú kultúru inhibujú, okrem lokalizovania primárnej infekcie, aj intercelulárny prenos vírusu. Prísun protilátok do média krátko po infekcii bunkovej kultúry znižuje počet primárnych infekčných ložísk, a to zrejme neutralizáciou tej časti na bunky adsorbovaného vírusu, ktorá bola ešte dostupná účinku špecifickej protilátky. Svedčí o tom zistenie, že prísun protilátok za šesť hodín *p. i.* vývoj primárnych fluoreskujúcich ložísk neovplyvnil. Rovnaké zistenia zaznamenali pri víruse *H. simplex* Farnham (1958) a pri víruse Aujeszkého choroby Žuffa ai. (1970).

Nález sekundárnych fluoreskujúcich ložísk, zisťovaný na kultúrach v UM bez protilátok za 18 hodín *p. i.*, poukazuje na rýchle uvoľňovanie vírusu PI-3 z buniek do kultivačného média. Voľný vírus a pozitívna hemadsorpcia sa zisťujúca za dve hodiny po zahájení tvorby bunecného vírusu (Massab a Loh, 1962; Bürki ai. 1966; Ludwig a Paulsen, 1968; Žuffa a Chumchal, 1977).

Zistenia o účinku protilátok na priebeh infekcie bunkovej kultúry vírusom PI-3 prispieva k poznaniu významu a mechanizmu účinku koľostrom získaných protilátok na infekciu dýchadiel a jej rozsev v rámci organizmu.

Literatúra

- BLACK, F. L. — MELNICK, J. L.: Micro-epidemiology of poliomyelitis and herpes-B infections. Spread of the viruses within tissue cultures. *J. Immun.*, 74, 1955, s. 236-242.
- BÜRKI, F. — FISCHER, K. — FREY, H.: Vergleichende virologische, fluoreszenz-serologische und cytologische Untersuchungen mit einem bovinen Parainfluenza-3-Virus. *Zentbl. Bakt. Parasitkde, Hyg., I. Orig.*, 200, 1966, s. 191-201.
- DINTER, Z. — HERMODSSON, S. — BAKOS, K.: Studies on variants of a bovine strain of parainfluenza 3 virus. 1. Isolation and growth characteristics. *Acta path. microbiol. scand.*, 49, 1960, s. 485-492.
- FARNHAM, A. E.: The formation of microscopic plaques by *herpes simplex virus* in HeLa cells. *Virology*, 6, 1958, s. 317-327.
- HAHNEFELD, H. — HAHNEFELD, E. — SCHULZE, P.: Untersuchungen zum Ausbreitungsmodus des Virus der infektiösen bovinen Rhinotracheitis (IBR) und des Bläschenausschlages des Rindes (IPV) in Kälbernieren-Einschichtzellkulturen. *Arch. exp. VetMed.*, 19, 1965, s. 1405-1429.

- KITA, J. — GILLESPIE, J. H.: Susceptibility of various types of cell cultures to three strains of bovine parainfluenza III virus. *Cornell Vet.*, 58, 1968, s. 217-235.
- LUCZAK, M. — KORBECKI, M.: Comparative studies on susceptibility of established cell lines to parainfluenza 3 virus. *Acta virol.*, Praha, 14, 1970, s. 279-284.
- LUDWIG, H. — PAULSEN, J.: Isolierung und fluoreszenzserologische Untersuchung von Parainfluenza-3-Viren aus Vaginal- und Nasentupfen vom Rind. *Zentbl. VetMed.*, B, 16, 1969, s. 231-239.
- MAASAB, F. H. — LOH, P. C.: Fluorescent antibody studies in tissue culture of parainfluenza-3 infection. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 169, 1962, s. 897-900.
- MAATEN, M. J. VAN DER: Immunofluorescent studies of bovine parainfluenza 3 virus. I. Cell cultures and experimentally infected hamsters. *Can. J. Comp. Med.*, 33, 1969, s. 134-140.
- MENGELING, W. L.: A fluorescent micro-plaque assay for hog cholera virus. Localization of infection with homologous antiserum. *Arch. ges. Virusforsch.*, 23, 1968, s. 27-39.
- MOHANTY, G. C. — COTTRAL, G. E.: Foot-and-mouth disease virus: Rapid assay using the fluorescent antibody technique. *Arch. ges. Virusforsch.*, 32, 1970, s. 348-358.
- POSPÍŠIL, Z. — MACHATKOVÁ, M. — ROZKOŠNÝ, V. — MENŠÍK, J.: Demonstration of parainfluenza-3 virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine foetal organ cultures by immunofluorescence and horseradish peroxidase techniques. *Acta vet.*, Brno, 44, 1975, s. 189-196.
- SOMININA, A. A. — ZUBSHITSKY, Yu. N. — SMORODINTSEV, A. A.: Dynamics of immunofluorescence and infectivity of parainfluenza 3 virus in susceptible cells. *Acta virol.*, Praha, 11, 1967, s. 424-431.
- WHEELER, C. E.: Further studies on the effect of neutralizing antibody upon the course of herpes simplex infections in tissue culture. *J. Immun.*, 84, 1960, s. 394.
- ZUFFA, A. — MATIS, J. — SALAJ, J.: Microplaque titration of pseudorabies virus by immunofluorescence. *Acta virol.*, Praha, 14, 1970, č. 2, s. 133-144.
- ZUFFA, A. — CHUMCHAL, R. — GRUNERT, Z.: Mikroepidemiologie und Mikroplaque-titration des Virus der infektiösen Rhinotracheitis des Rindes auf primären Kälbernierenzellen mittels Immunofluoreszenz. *Arch. exp. VetMed.*, 30, 1976, s. 441-457.
- ZUFFA, A. — CHUMCHAL, R. — MENŠÍK, J.: Imunofluorescencia s vírusom PI-3 — príprava a vyhodnotenie konjugátov z imúnnych sér viacerých druhov zvierat. *Vet. Med.*, Praha, 22, 1977, č. 10, s. 577-588.
- ZUFFA, A. — CHUMCHAL, R.: Imunofluorescencia s vírusom PI-3 — imunofluorescentné nálezy na kultúrach telacích obličiek infikovaných rozdielnymi dávkami a kmeňmi vírusu. *Vet. Med.*, Praha, 23, 1978, č. 4, s. 000-000.

Došlo dňa 29. 11. 1977

ЖУФФА, А. — ХУМХАЛ, Р. (Научно-исследовательская и экспериментальная база, Биовета, Нитра): Иммунофлуоресценция вирусом PI-3 — изучение разных рабочих условий детектирования вирусной инфекции путем флуоресценции на нескольких видах клеточных культур. *Vet. Med.*, Praha, 23, 1978 (5): 289-304.

Флуоресцентная техника была использована для определения чувствительности нескольких видов клеточных культур к заражению вирусом параинфлюэнцы 3 (PI-3). Наиболее восприимчивыми к вирусному заражению оказались культуры из телячьих почек, причем не отмечено различий между первичными культурами и культурами I и II субпассажей, т. е. между свежесращенными и инкубированными в течение 7 дней при 37 °C культурами. Такие же значения инфекционных титров, как на культурах из телячьих почек, установлены с помощью иммунофлуоресценции также на ягнячьих почечных клетках, хотя заражение не сопровождалось цитопатическими изменениями. На свиных почечных клетках заражение имело место лишь при прививке 10⁵ТКID₅₀ и повышенными дозами вируса, причем инфекция протекала медленно и без заметных цитопатических изменений. Флуоресцентные диагнозы на отдельных видах ткани одинаковы. Присутствующие в культивационной среде антитела препятствуют рассеянию инфекции путем нейтрализации высвобождаемого из клеток вируса, но не и первичной инфекции. Рост содержания антител в среде приводил — посредством ингибирования внутриклеточного вируса — к замедлению роста первичных флуоресцирующих очагов.

вирус PI-3; иммунофлуоресценция; восприимчивость отдельных тканей; перенос заражения; действие антител

ŽUFFA, A. — CHUMCHAL, R. (Research and Development Department, Bioveta, Nitra): *Immunofluorescence with Virus PI-3 — Investigation of Different Working Conditions of Detection of Virus Infection by Immunofluorescence on Several Kinds of Cell Cultures*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 289-304.

We used the fluorescence method for the investigation of the sensitivity of several kinds of cell cultures to the infection with the parainfluenza virus 3 (PI-3). Cultures from calf kidneys were the most sensitive while we did not determine any differences between primary cultures and cultures of the first and second subpassages and/or freshly cultivated or incubated cultures over seven days at a temperature of 37°C. Equal values of infection titres like on the cultures of calf kidneys were determined by immunofluorescence also on the kidney cells of lambs though the presence of the infection was not accompanied by cytopathic changes. Infection of pig kidney cells appeared only after the inoculation of 10^5 TKID₅₀ and higher doses of the virus, the infection having a very slow course of development without detectable cytopathic changes. Fluorescent findings were identical in different tissues. Antibodies present in the culture medium stopped the spreading of the infection by neutralizing the virus released from the cells, however, not the primary infection. The increase in the content of antibodies in the medium led — by inhibiting the intercellular virus — to the slowing down of the growth of primary fluorescent lesions.

PI-3 virus; immunofluorescence; sensitivity of different tissues; infection transmission; effect of antibodies

ŽUFFA, A. — CHUMCHAL, R. (Forschungs- und Entwicklungsabteilung, Bioveta, Nitra): *Die Immunofluoreszenz durch PI-3-Virus und Studium unterschiedlicher Arbeitsbedingungen zur Detektion der virusbedingten Infektion durch Immunofluoreszenz an mehreren Arten von Zellkulturen*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 289-304.

Wir benutzten die Fluoreszenztechnik zum Studium der Empfindlichkeit mehrerer Arten von Zellkulturen der Infektion durch Parainfluenz 3 — Virus (PI-3) gegenüber. Am empfindlichsten der Virusinfektion gegenüber zeigten sich die aus Kälbernieren gewonnenen Kulturen wobei keine Unterschiede zwischen den primären Kulturen und den Kulturen ersten und zweiten Subpassage bzw. den frisch gewonnenen Kulturen und den im Laufe von sieben Tagen inkubierten (Temperatur 37°C) Kulturen festgestellt werden konnten. Die gleichen Werte der Infektionstiter wie bei den aus Kälbernieren gewonnenen Kulturen stellten wir mit Hilfe von Immunofluoreszenz ebenfalls bei den Lammnierenzellen fest, obwohl die Infektion von der Entwicklung der zytopathischen Veränderungen nicht begleitet wurde. Bei den Schweinenierenzellen kam es zur Infektion nur im Falle der 10^5 TKID₅₀-Impfung und der Anwendung von höheren Virusgaben, wobei die Infektion sehr langsam vor sich ging und ohne feststellbare zytopathische Veränderungen. Die Fluoreszenzbefunde waren an den einzelnen Gewebearten gleichwertig. Die im Kultivierungsserum enthaltenen Antikörper verhinderten die Ausbreitung der Infektion durch Neutralisierung des aus den einzelnen Zellen freigemachten Virus, aber sie waren außerstande die primäre Infektion zu eliminieren. Die Steigerung des Gehaltes des Mediums an Antikörpern führte — durch Inhibition des Interzellularvirus — zur Verzögerung des Wachstums der primären fluoreszierenden Lesien.

PI-3-Virus; Immunofluoreszenz; Empfindlichkeit der unterschiedlichen Gewebearten; Infektionsübertragung; Wirkung der Antikörper

Adresa autorov:

Doc. MVDr. Alojz Žuffa, CSc., ing. Richard Chumchal, Výskumné a vývojové pracovisko, Bioveta, 949 91 Nitra

ŠTÚDIUM ŠPIRÁLOVITÝCH A VRETIENKOVITÝCH ÚTVAROV V KULTÚRACH *BACILLUS LARVAE* (WHITE, 1906), PÔVODCU MORU VČELIEHO PLODU

H. Križanová, Z. Koppel, J. Horváth, M. Beseda, M. Halaša

KRIŽANOVÁ, H. — KOPPEL, Z. — HORVÁTH, J. — BESEDA, M. — HALAŠA, M. (Ústredný štátny veterinárny ústav, Bratislava; Vysoká škola veterinárska, Košice): *Štúdium špirálovitých a vretienkovitých útvarov v kultúrach Bacillus larvae* (White, 1906), *pôvodcu moru včelieho plodu*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 305-315.

Autori sa už dlhšie zaoberajú štúdiom bakteriálnych ochorení včelieho plodu, predovšetkým moru a hniloby (americkej a európskej hniloby). Pri štúdiu kultúr pôvodcu moru včelieho plodu — *Bacillus larvae* (White, 1906), a to tak u čerstvo izolovaných, ako aj u zbierkových kmeňov tohoto mikroorganizmu, zistili, že pri more včelieho plodu sa v patologickom materiáli vyskytujú okrem typických paličiek *B. larvae* tiež nepohyblivé špirálovité formy, ktoré se v literatúre obvykle opisujú ako fragmenty, alebo vývojové formy *B. larvae*. Zistili ďalej, že tieto špirálovité formy sa v kultúre *B. larvae* organizujú do tvaru „vretienok“, pomnoženie ktorých je závislé od prítomnosti paličiek *B. larvae* a ich „vývoj a množenie“ možno pozorovať na vlhkom želatínovom agare v Petriho miske obrátenej hore dnom v obyčajnom mikroskope pri zväčšení 10 X 10. V použitom tekutom kombinovanom médiu sa tieto útvary rozpadajú do špirálovitých nepohyblivých foriem, pričom pri spätnej kultivácii na pevné médium opätovne nadobúdajú vretienkovité formy s priečnym poludníkovým usporiadaním (v rôznom množstve). Farbenie na dôkaz prítomnosti nukleových kyselín nevylučuje možnosť, že ide o samostatné mikroorganizmy, ktoré síce nemožno ofarbiť bežnými farbiacimi metódami, ale možno ich znázorniť kontrastne podľa Burriho, alebo striebrením podľa Kleina. Tieto mikroorganizmy sa síce podarilo oddeliť, avšak bez paličiek *B. larvae* sú porasty týchto útvarov slabé.

Pestis apium americana; *Bacillus larvae* (White, 1906); špirálovité a vretienkovité útvary v kultúrach *Bacillus larvae* (White, 1906)

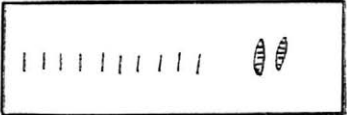
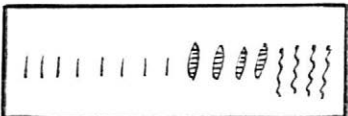
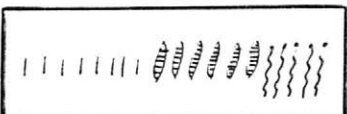
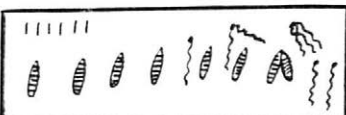
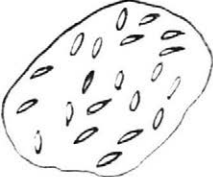
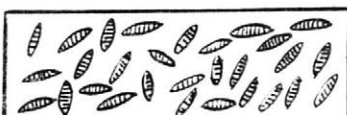
Keď sa na území Slovenska po dlhej dobe objavil v r. 1972 znova mor včelieho plodu, robila presná identifikácia a typizácia pôvodcu *Bacillus larvae* White, 1906 [Bergey's Manual, 1975] značné ťažkosti, najmä preto, že kultúry pomerne rýchlo hynuli tak na pevných, ako aj v tekutých médiách obohatených krvou, sérom, alebo sacharidmi. V preparátoch zo starších kultúr sa zisťoval kokoidný rozpad, farbiaci sa slabo gram-negatívne. Rekultivácia takejto populácie bola veľmi ťažká, alebo sa vôbec nedarila.

Pri zatriedovaní *Bacillus larvae* (ďalej len *B. l.*) sme postupovali podľa identifikačného kľúča Wolfa a Barkera (1968) a Bergey's Manuala (1957, 1975), pričom kmene vyžadovali pre svoj rast natívnu bielkovinu (krv, sérum). Izolované kmene neprodukovali plyn v pôdach obohatených sacharidmi a zatriedili sa

do II. skupiny. Išlo o gram-pozitívne paličky, s oválnymi hrubostennými spórmi. Kmene nerástli pri teplote 60 až 65 °C ani pri pH 6,0 alebo pH 7,0. Podľa Wolfa a Barkera (1968) je *B. l.* patogénny len pre článkovce.

Borchert (1966, 1974), zdôrazňuje, že pri vyšetrovaní rozterov včelích lariev pri more včelieho plodu (americká hniloba včelieho plodu) zisťoval vedľa typických paličiek *B. l.* akési „vrkôčiky“, ktoré považoval za poprepletané bičky tohto

I. Schematické znázornenie tvorby vretienkovitých útvarov v kultúre *B. larvae* na želatínovom agare a ich prejav v odtlačkovom preparáte — Schematic representation of the development of spindle-shaped formations in the culture of *B. larvae* on gelatine agar and their print in an impression preparation

		I. Odtlačkový preparát z kultúry zo želatínového agaru (lumipan, apochromátová šošovka); zväčšenie 10 X 40 X 1,5 bez krycieho skielka		II. Mikroskopický obraz vretienok v kultúre na vlhkom želatínovom agare (Petriho miska obrátená hore dnom); obyčajný mikroskop, zväčšenie 10 X 10	
1	24 hodín				
2	48 hodín				
3	72 hodín				
4	96 hodín				
5	štyri týždne až niekoľko mesiacov				

zárodka a ktoré Maasen (cit. podľa Borcherta, 1974) považuje za *Spirilla apis*. Ďalej udáva, že obdobné formy môžu tvoriť aj iné druhy zárodkov. Otázka výskytu útvarov opísaných Borchertom (1966, 1974) zaujala aj nás a chceli sme si overiť údaje vyššie uvedených autorov.

MATERIÁL A METÓDA

Na izoláciu a údržbu kultúr *B. l.* sa nám lepšie osvedčil krvný agar ako klasická a pritom zložitá Whitteho žltková pôda.

Krvný agar sa pripravoval z Blood agar base Oxoid No. 2, alebo z Brain heart dextrose bujon (Oxoid, alebo Difco), doplnený Oxoid agarom No. 3, v 2% koncentrácii so 7 až 10% defibrovanej baranej krvi, ktorý vlastne v svojom zložení plne poskytuje vhodné kultivačné médium pre *B. l.* Na pasážovanie kmeňov a ich štúdium sme používali želatínový agar tohoto zloženia: Blood agar base NO. 2 — 4,0 g, aqua dest. 100,0 ml. Pre prípravu mäsopeptónovej želatíny: mäsopeptónový bujon — 100,0 ml, želatína — 15,0 g.

100,0 ml pripraveného agarového základu a 80,0 ml pripravenej mäsopeptónovej želatíny sa za tepla zmieša; vylieva sa v tenkej vrstve na Petriho misky (aby bolo možné priamo mikroskopické odčítanie z platne obrátenej hore dnom), alebo sa toto médium rozplúže do skúmaviek v množstve asi 10,0 ml a nechá stuhnúť v šikmej polohe. Po stuhnutí sa prevrstvuje bujonom pripraveným z pečenej infúzie o pH 7,2.

Na týchto médiách sme študovali rastové vlastnosti a morfológiu kolónií 34 čerstvo izolovaných kmeňov, ako aj kmeňov kontrolných, pochádzajúcich zo zbierky kmeňov referenčného laboratória pre choroby včiel v Plzni a dva zbierkové kmene zo Štátnej zbierky kultúr CCM (5875, 5680).

Kultivácia z patologicky zmenených lariev, ako aj subkultivácia izolovaných kmeňov sa robila za aerobných podmienok pri teplote 37°C; inokulované Petriho misky sa zaparafinovali.

Pri vyšetrovaní rozterových preparátov z patologicky zmenených lariev sme podobne ako Borchert (1975) zisťovali vo fázovom kontraste Lumipanu pri zväčšení 10 × 40 × 1,5 vedľa typicky pohyblivých paličiek a nepohyblivých spór v menšom počte aj špirálovito stočené nepohyblivé útvary, ktorých dĺžka bola cca 3 až 10 μ a šírka v strede 0,4 až 0,5 μ a ktoré boli na oboch koncoch zahrotené.

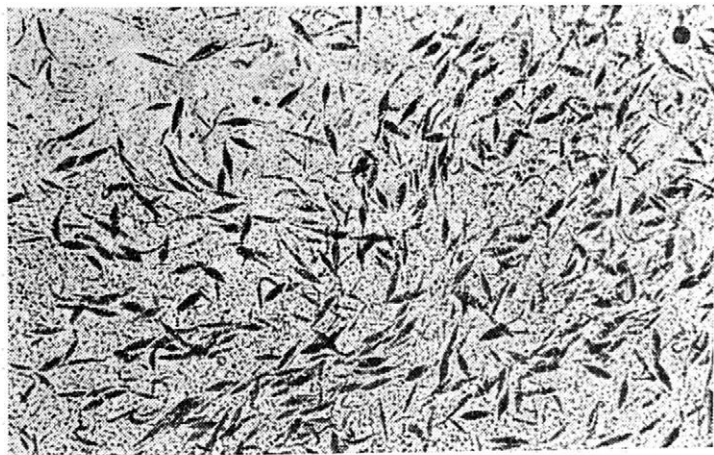
Tieto špirálovité útvary sa zisťovali aj v kultúrach *B. l.*, ak sa tieto inokulovali na šikmý krvný, alebo na šikmý želatínový agar, na ktorý sa po stuhnutí navrstvilo 5 až 8 ml mäsopeptónového bujonu, alebo bujonu pripraveného z pečenej infúzie o pH 7,2. Tieto útvary sa zisťovali v tekutej časti za 48 i viac hodín, a to v miestach, kde sa vytváral „obláčkovitý zákal“. Počet týchto útvarov v tekutine na šikmom krvnom alebo želatínovom agare, prevrstvenom bujonom, sa zvýšil s úbytkom typických paličiek (schematické znázornenie v tab. I.).

V tekutej časti šikmého krvného alebo želatínového agaru za inkubácie pri teplote 37°C sa objavili v prvých 24 hodinách typicky pohyblivé paličky *B. l.*, ale už za ďalších 24 až 48 hodín sa objavili kokovité útvary o priemere 1 až 2 μ, napojené buď na koniec paličky, na jej stred (niekedy 2–3 guľôčky na jednom bakteriálnom tele), alebo ležali voľne.

Opísané špirálovité útvary (prítomné najviac v obláčkovitom zákale) boli často zakončené guľôčkou. Tieto špirálovité útvary neprijímali žiadne farbivo, guľôčky sa dali odfarbiť slabou gram-negatívne.

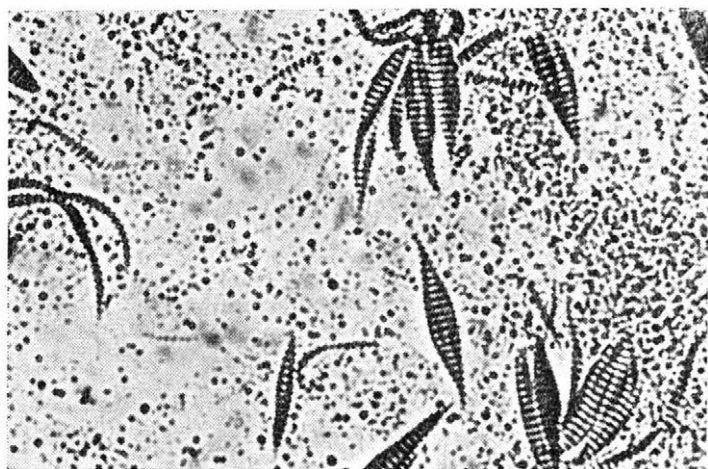
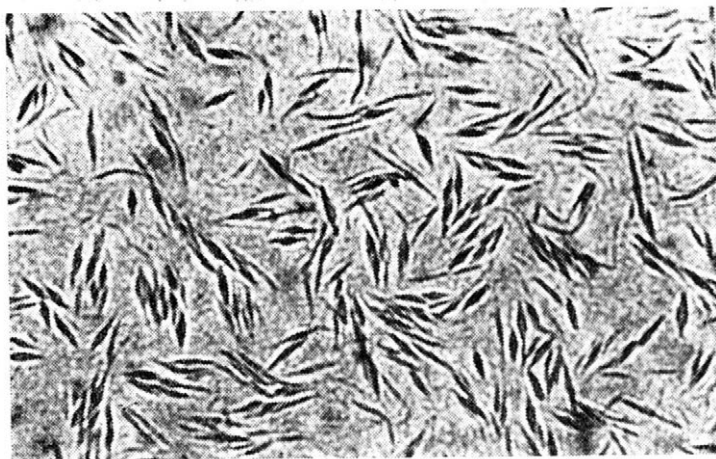
V kultúrach starých niekoľko dní (až týždňov) boli na pevnom želatínovom agare v Petriho miskách tieto útvary tiež prítomné, ale formovali sa už do tvaru „vretienka“ (obr. 1–4). Svoju charakteristickú formu si udržali aj na starých, úplne vysušených želatínových agaroch (zistené mikroskopicky priamo na platniach obrátených hore dnom). Tieto vretienkovité útvary sa zisťovali v každej kultúre *B. l.* nami vyšetrovaných kmeňov, ako aj u všetkých kmeňov kontrolných. Boli viditeľné priamo na platni, pri zväčšení 10 × 10. Po ich objavení a pomnožení začala kultúra javiť kokoidný rozpad, až sa celá zmenila na samé „vretienkovité útvary“. Ak sa však na kultiváciu použil miesto vlhkého želatínového agaru vysušený, kedy sa paličky nemohli pohybovať po suchej platni, dochádzalo ku skorej sporulácii paličiek a vyrástlo malé množstvo uzatvorených kolónií. V takom prípade sa tvorilo oveľa menej vretienok.

V odtlačkových preparátoch z mladých kultúr (18–24 h), zhotovených z vlhkého želatínového agaru, bolo viditeľné množstvo špirálovitých útvarov, posplietaných do seba spolu s paličkami *B. l.* (obr. 5–10).



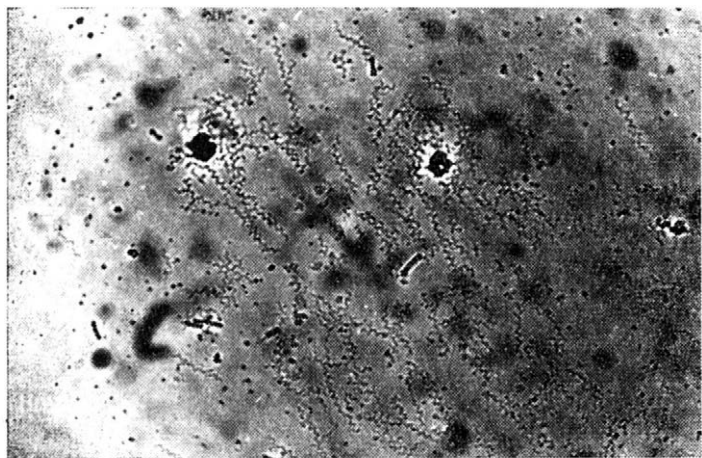
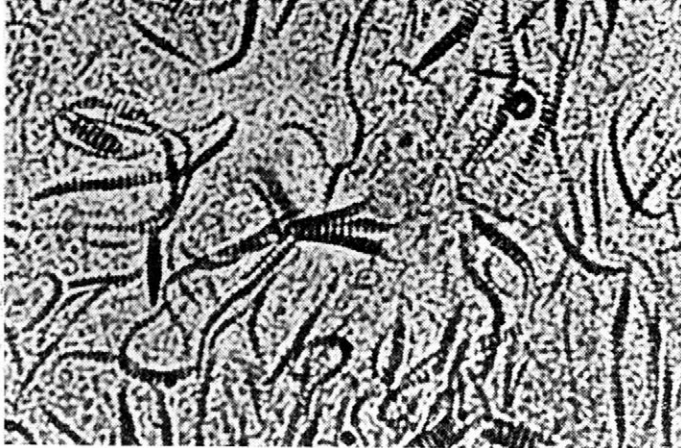
1. Odtlačkový preparát (bez krycieho skielka; nefarbený) zo želatínového agaru z Petriho misky, z päťdňovej kultúry (lumipan, apochromátová šošovka 20) — Impression preparation (without cover slip, unstained) from gelatine agar from the Petri dish, from a five-day-old culture (lumipan, apochromate lens 20)

2. Petriho miska obrátená hore dnom, päťdňová kultúra na želatínovom agare (lumipan, apochromátová šošovka 10) — Petri dish turned upside down, five-day-old culture on gelatine agar (lumipan, apochromate lens 10)



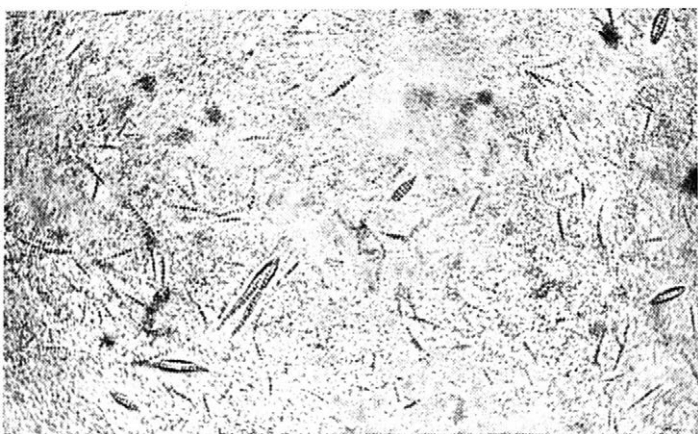
3. Odtlačkový preparát (bez krycieho skielka, nefarbený) z päťdňovej kultúry zo želatínového agaru (lumipan, apochromátová šošovka 40 — detail) — Impression preparation (without cover slip, unstained) from a five-day-old culture from gelatine agar (lumipan, apochromate lens 40 — detail)

4. Odtlačkový preparát (bez krycieho skielka, nefarbený) zo želatínového agaru, 60-dňová kultúra (lumipan, apochromátová šošovka 40, detail) — Impression preparation (without cover slip, unstained) from gelatine agar, sixty-day-old culture (lumipan, apochromate lens 40, detail)



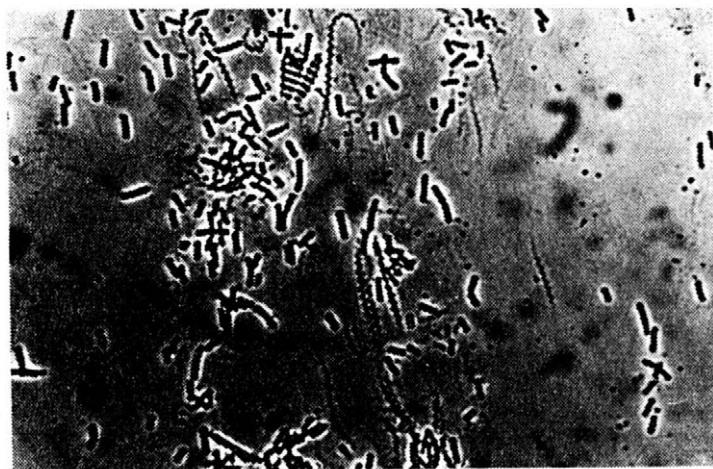
5. Odtlačkový preparát z mladej kultúry (bez krycieho skielka, nefarbený) zhotovený zo želatínového agaru z Petriho misky, po zmytí povrchovej kultúry mäso-peptónovým bujónom (lumipan, apochromátová šošovka 40) — Impression preparation from a young culture (without cover slip, unstained) from gelatine agar from the Petri dish, after washing off the surface culture with meat-peptone broth (lumipan, apochromate lens 40)

6. Odtlačkový preparát zo želatínového agaru z Petriho misky (bez krycieho skielka, nefarbený), vretienkovité útvary rôzneho tvaru a usporiadania (lumipan, apochromátová šošovka 20) — Impression preparation from gelatine agar from the Petri dish (without cover slip, unstained), spindle-shaped formations of different shapes and arrangement (lumipan, apochromate lens 20)



V odtlačkových preparátoch z kultúry *B. l.* študovaného kmeňa Vč 166-70 na pevnom želatínovom agare a pri kontrastnom ofarbení podľa Burriho metódy sa vretienka javili ako závitnicovité útvary, ktoré boli na oboch koncoch zahrotené; prípadne ak išlo o samostatné väčšie špirálovité útvary, bolo viditeľné, že sa končia guľôčkou.

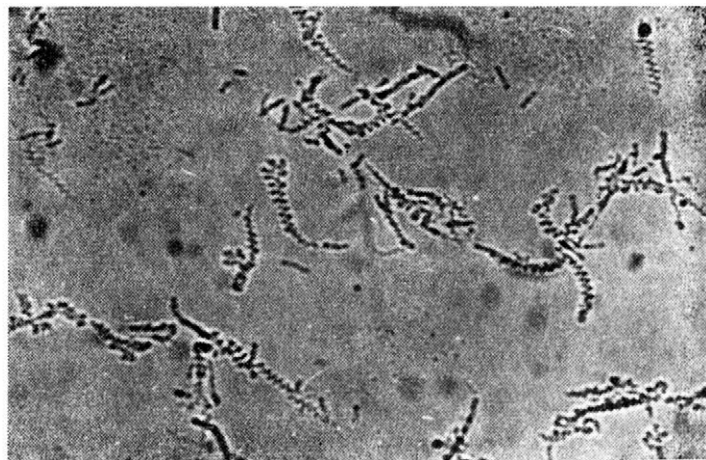
7. Odtlačkový preparát z mladej kultúry (bez krycieho skielka, nefarbený) zhotovený zo želatinového agaru z Petriho misky po zmytí povrchovej kultúry mäso-peptónovým bujónom (lumipan, apochromátová šošovka 40) — Impression preparation from a young culture (without cover slip, unstained) from gelatine agar from the Petri dish, after washing off the surface culture with meat-peptone broth (lumipan, apochromate lens 40)



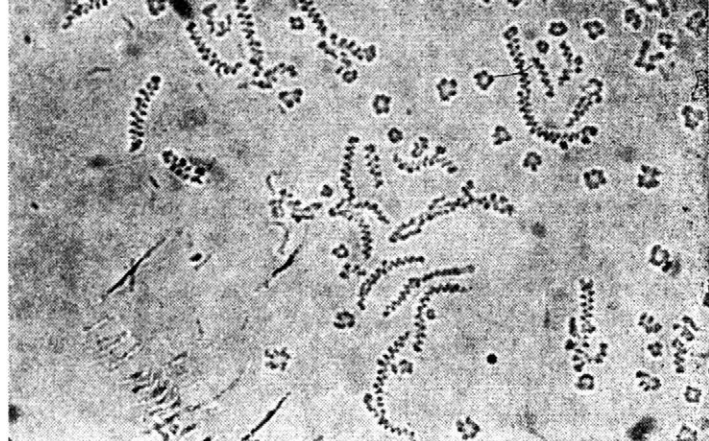
8. Odtlačkový preparát z mladej kultúry (bez krycieho skielka, nefarbený) zhotovený zo želatinového agaru z Petriho misky po zmytí povrchovej kultúry mäso-peptónovým bujónom. Paličky *B. l.*, vretienkovitý útvar v štádiu delenia a špirálovité formy (lumipan, apochromátová šošovka 40) — Impression preparation from a young culture (without cover slip, unstained) from gelatine agar from the Petri dish after washing off the surface culture with

meat-peptone broth. Rods of *B. l.*, spindle-shaped formation at the stage of division and the spiral forms (lumipan, apochromate lens 40)

9. Odtlačkový preparát z mladej kultúry zo spodu želatinového agaru z Petriho misky (časť, ktorá sa dotýka skla). Paličky *B. l.* a špirálovité útvary (hrubšie, ako z povrchových odtlačkov) (lumipan, apochromátová šošovka 40) — Impression preparation from a young culture from the bottom of gelatine agar from the Petri dish (the layer in contact with glass). Rods of *B. l.* and spiral formations (thicker than from the surface impressions) (lumipan, apochromate lens 40)



10. Odtlačkový preparát z mladej kultúry zo spodu želatínového agaru z Petriho misky (časť, ktorá sa dotýka skla). Špirálovité útvary pomerne zhrubnuté (lumipan, apochromátová šošovka 40) — Impression preparation from a young culture from the bottom of gelatine agar from the Petri dish (the layer in contact with glass). Spiral formations, appreciably thick (lumipan, apochromate lens 40)



V odtlačkovom preparáte z kultúry vypestovanej na pevnom želatínovom agare ofarbenom podľa Grama sa zisťovali gram-negatívne kokoidné útvary, spóry, gram-pozitívne paličky a pri zníženom kondenzore, podobne ako v preparátoch ofarbených podľa Giemsa-Romanovského, boli viditeľné (spolu so spórmi a paličkami) len nejasné kontúry vretienok s náznakom priečneho poludníkového usporiadania. Vretienka boli veľké 5–10 μ .

V nativných preparátoch zhotovených z uvedených kultúr (u študovaného kmeňa Vč 166-70) pri použití fázového kontrastu sa tieto pozorované útvary javili ako vretienkovité útvary závitnicovitého usporiadania. Súčasne sa zisťovali aj samostatné špirálovité útvary, alebo špirálovité útvary v štádiu oddeľovania sa od základného vretienkovitého útvaru (závitnicovitého usporiadania — obr. 1, 3, 6), ktoré sa mohli dobre znázorniť pri kontrastnom ofarbení podľa Burriho metódy. Počet typických paličiek *B. l.* sa v takýchto kultúrach nápadne znížil a v zornom poli vzrástol počet kokoidných útvarov. Kresba vretienkovitých útvarov vystupovala zreteľnejšie, ak sa odtlačkový preparát prezeral bez krycieho skielka v lumipane s apochromátovou šošovkou pri zväčšení 10 $\times$ 40 $\times$ 1,5.

Pokúsili sme sa vretienka a špirálovité útvary od typických paličiek *B. l.* oddeliť v bujóne, pripravenom z pečeňovej infúzie o pH 7,2, ktorý obsahoval v 1 ml 2500 m. j. penicilínu a 2500 gamma mycostatínu, a to tak, že sme kultúru s bohatou tvorbou týchto útvarov inokulovali do spomenutého pečeňového bujónu a uložili do chladničky pri teplote 3 až 4 °C.

Spätná kultivácia *B. l.* z takýchto kultúr (ovplyvnených antibiotikami) sa už nedarila. Typické paličky z takto ošetrenej kultúry vymizli a zostávali len neporušené vretienkovito-závitnicovité útvary, dokázateľné v nativnom preparáte vo fázovom kontraste. Ak sa jedna kvapka z takejto kultúry inokulovala na želatínový agar, ktorý sme používali aj na pozorovanie tvorby a prípadné znázornenie vretienkovitých útvarov, boli tu tiež prítomné.

Zdalo sa, že vretienkovité útvary, získané z kultúry ošetrenej antibiotikami javia na pevnom želatínovom agare v Petriho miske slabý rast, voľným okom nepozorovateľný, ale dobre odčítateľný v mikroskope pri zväčšení 10 $\times$ 10 priamo na platni (obrátenej hore dnom) v podobe jemného malého ostrovčekovitého políčka o priemere 1 až 2 mm.

V rámci štúdia vretienkovitých útvarov sme obvykle inokulovali subkultúry na čerstvo vyliate médiá (nevysušené, vlhké, bez antibiotík); inokulované platne sa nepredbežne zaparafinovali, aby sa zabránilo vysušiu. Inokulácia sa robila len čiarou (alebo agarovým bločkom), bez rozkluckovania. Keď sme za 24 až 48 hodín prezerali platne pod mikroskopom, zistili sme, že vretienka boli pasívne nesené paličkami *B. l.* až na okraj kolónií. Ako sa kolónie rastom rozširovali, resp. ako sa paličky po vlhkej platni pohybovali smerom k okrajom (čo sme sledovali zase pod mikroskopom, priamo na platni obrátenej hore dnom), zistili sme, že vretienka sú naozaj plavené a pasívne roznášané po platni aktívnym pohybom paličiek *B. l.* Preto aj rozloženie týchto útvarov bolo nerovnomerné a pre subkultúry sa muselo vyberať z miest najhornejšie pomnoženej kultúry, kde vretienka vytvárali celé „hniezda“, niekedy vlnito usporiadané podľa pohybu paličiek *B. l.*

Ak sa kultúra *B. l.* študovaného kmeňa Vč 166-70, vypestovaná na pevnom želatínovom agare (ktorá obsahovala hore opísané útvary), inokulovala na šikmý želatínový agar preliaty pečenečným bujónom o pH 7,2, v množstve asi 5 až 8 ml, objavili sa vretienka v tekutej časti média (v pečenečnom bujóne), kde sa vytvoril za 48 hodín (prípadne neskôr) asi 2 cm pod povrchom (alebo v dolných vrstvách) „obláčkovitý zákal“, avšak už vo forme nepohyblivých špirálovitých útvarov, do ktorých sa vretienka rozpadali.

V odtlačkových preparátoch z mladej kultúry boli viditeľné súčasne s paličkami aj špirálovité útvary, a to buď samostatné, alebo spletené už do formy vretienka (obr. 6, 7, 8).

V snahe objasniť, či je možné v týchto útvaroch dokázať prítomnosť nukleových kyselín, pokúsili sme sa tieto znázorniť metódou uvedenou v monografii Kyselyho a Pósalakyho (1964).

Vzhľadom na to, že nešlo o tkanivá, ale o odtlačkové preparáty z kultúr, sme si túto metódu primerane adaptovali.

Potrebné roztoky podľa uvedenej monografie:

A: kmeňový roztok:

0,10% vodný roztok akridinovej oranže (udržiava sa v chladničke);

B. farbiace roztoky:

0,01% roztok akridinovej oranže, ktorý sa získa zriedením z reagensu „A“ s fosfátovým pufróm (reagens „C“), pričom podľa uvedenej metodiky sa môže nahradiť pufróm podľa Mc Illvaina;

C: 1/15 m fosfátový pufer pH 6;

D: roztok chloridu vápenatého:

CaCl₂ 11,099 g
aqua dest. 1000,0 ml

E: 1,0% roztoky kyseliny octovej.

Podľa tejto metodiky farbenia pri histologickom vyšetřovaní tkanív svieti DNK vo fluorescenčnom mikroskope zeleno, kým RNK v cytoplazme a jadrá červeno.

Použitá modifikovaná metodika:

1. odtlačkový preparát z dobre vyrastenej kultúry s bohatou tvorbou vretienkovitých útvarov (kultúry staré približne 5–21 dní), voľne usušený na vzduchu;
2. preparát fixovaný éter alkoholom;
3. na preparát sa navrstvila 1% kyselina octová;
4. preparát sa opláchnol šetrne destilovanou vodou;
5. farbenie reagensom „B“ po dobu 3 minút;
6. preparát sa preliel reagensom „C“;
7. diferencovanie 1 až 2 minúty v reagensi „D“;
8. šetrné opláchnutie pufróvým roztokom;
9. preparát sa prikryl krycím skielkom čís. „0“, okraje sa zaparafinovali (aby sa predišlo vysušeniu) a pozoroval sa vo fluorescenčnom mikroskope ML-2 (filtre: SS 15-2 a FS-1-2, pri zväčšení 2 × 40 a 5 × 70 – vodná imerzia).

Pri zhotovovaní mikrofotografií sa použilo originálne zariadenie, ktoré dodáva výrobca k uvedenej aparátúre. Použil sa objektív 40 alebo 70, premietací okulár zväčšujú trikrát alebo päťkrát.

Nakoľko autori v uvedenej monografii dávajú možnosť výberu pufróvých roztokov, použili sme Mc Illvainov pufer, ktorý sa nám zdal pre túto prácu vhodnejší.

Vzhľadom na to, že išlo o odtlačkové preparáty z kultúr vypestovaných na pevnom médiu a nie o tkanivá, vynechali sme dehydrovanie v alkoholoch. Pri dehydrovaní alkoholom (tak ako aj pri ostatných premývaniach, dochádzalo k uvoľňovaniu vzájomnej väzby „vretienok“ od „paličiek“ a k následnému odplavovaniu celej odtlačkovej kultúry zo skielka. Preto sa všetky použité reagenty veľmi opatrne zo skielka zlievali.

Vretienkovitý útvar študovaného kmeňa Vč 166-70 za použitia akridinovej oranže (preparát farbený podľa metódy Kyselyho a Pósalakyho) má zelenkavú farbu.

Pri mikroskopickom vyšetrovaní natívnych preparátov zhotovených zo včelích lariev postihnutých morom včelieho plodu sme podobne ako Borchert (1966, 1974) zistili, že sú v nich prítomné aj nepohyblivé špirálovité útvary spolu s pohyblivými paličkami a nepohyblivými hrubostennými spórmi.

Tieto špirálovité útvary sa nefarbili podľa Grama, Griemsa-Romanowského, Ziehl-Neelsena, Wirtz-Conklina a nebolo ich možné moriť podľa Pulchera.

Špirálovité útvary a vretienka sa dali dobre znázorniť v odtlačkovom preparáte zhotovenom z kultúry vyrastenej na pevnom želatínovom agare, ak sa použila Burriho metóda.

Aka sa kultúra *B. l.* študovaného kmeňa VČ 166-70 inokulovala z pevného želatínového agaru na šikmý želatínový agar preliaty pečevým bujónom, v tekutej časti média sa za 48 hodín (alebo neskôr) vytvoril obĺákovitý zákal a opísané útvary vretienok sa rozplietli do formy nepohyblivých špirálovitých útvarov.

Pasážovaním sa docielilo väčšie pomnoženie, ak sa kultúry zakladali z dobre pomnožených miest, s bohatou tvorbou vretienok.

Netvorili sa však tak bohato na šikmej vaječnej pôde podľa Mc Coya, aj keď sa táto tak isto preliala pečevým bujónom.

Zistili sme skutočnosť, že tieto špirálovité alebo vretienkovité útvary sa objavujú v kultúrach *B. l.* a zreteľnejšie vystupujú, ak sa používa vlhké, nevysušené médium a ak sa platne ihneď po inokulácii nepriedušne zaparfinujú. K ich pomnoženiu dochádza priamo v kultúrach *B. l.* a zdá sa, ako by ich pomnoženie bolo priamo závislé od prítomnosti paličiek *B. l.* Natíska sa preto otázka, či nie sú štádiom ich regresie.

V študovaných kultúrach po objavení sa kokoidných útvarov paličky *B. l.* postupne mizli, prípadne na pevnej pôde stúpala počet vretienok, čo budilo dojem, že sú involučnými formami *B. l.* Nemohli by byť pôvodcami rozpadu kultúry? Ak typické paličky *B. l.* vymizli, nemnožili sa ani vretienkovité útvary.

V starých vysušených kultúrach si vretienka udržiavali svoju charakteristickú formu.

Na odtlačkovom preparáte zhotovenom z kultúry vypestovanej na pevnom želatínovom agare s bohatou tvorbou pozorovaných útvarov ofarbených podľa nami modifikovanej metodiky Kyszelyho a Pósalakyho (1964) sa za použitia akridínovej oranže javili vretienkovité útvary vo fluorescenčnom mikroskope zelené.

Natíska sa otázka, či sú pozorované útvary podľa Borcherta súčasťou *B. l.*, alebo ich určitou vývojovou formou. Ďalšou otázkou ostáva, prečo ich nemožno zafarbiť bežnými farbiciami metódami.

Taktiež ostáva nevyjasneným, prečo sa vretienka na šikmom želatínovom agare preliatom pečevým bujónom v tekutej časti rozplietajú do formy špirálovitých útvarov a tvoria neurčitú sieťovinu, z ktorej tieto špirálovité útvary vychádzajú, ako aj prečo sa na pevnej pôde (inokulovanej z tekutej časti, kde sa nachádzali špirálovité útvary) opätovne tvoria vretienka. Prípadne sa zisťuje aj ich „štiepenie“ a „oddeľovanie sa“ od prvotného vretienka. Skôr sa zdá, že „vretienka“ sú vlastne kolónie špirálovitých útvarov.

Dôkaz, že je tento špirálovitý útvar Vč 166-70 samostatným útvarom, alebo či on sám nemá podiel na vzniku americkej hniloby včelieho plodu, očakávame od začatých experimentov.

Zatiaľ netvrdíme, že ide o útvary samostatné, ktorých existencia je odkázaná na prítomnosť paličiek *B. l.*, hoci sa nám podľa predbežných štúdií zdá ich vzájomná existenčná závislosť skutočnosťou.

Technická spolupráca: T. Sedláčková, R. Brečelyová.

Literatúra

BERGEY'S MANUAL of determinative bacteriology. The Williams and Wilkins Comp., Baltimore 1957.

BERGEY'S MANUAL of determinative bacteriology. 8. ed., The Williams and Wilkins Comp., Baltimore 1975.

BORCHERT, A.: Die Krankheiten und Schädlinge der Honigbiene. S. Hirzel Verlag, Leipzig 1966.

BORCHERT, A.: Schädigungen der Bienenzucht durch Krankheiten, Vergiftungen und Schädlinge der Honigbiene. S. Hirzel Verlag, Leipzig 1974.

KYSZELY, G. — PÓBALAKY, Z.: Mikrotechnische und histochemische Untersuchungsmethoden. Akadémiai Kiadó, Budapest 1964, s. 503-504.

WOLF, J. — BARKER, A. N.: Identification of species of *Bacillus*. In: GIBBS B. M., SHAPTON D. A.: Identification Methods for Microbiologists. II. diel. Academic Press, London 1968, s. 94-109.

Došlo dňa 26. 4. 1977

КРИЖАНОВА, Г. — КОППЕЛ, З. — ГОРВАТ, Й. — БЕСЕДА, М. — ГАЛАША, М. (Центральный государственный институт ветеринарии, Братислава; Ветеринарный институт, Кошице): Изучение спиральных и веретенообразных образований в культурах *Bacillus larvae* (White, 1906), возбудителя чумы пчелиной детки. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 305-315.

Авторы уже давно занимаются изучением бактериальных заболеваний пчелиной детки, прежде всего гнильца американского и гнильца европейского. При изучении культур возбудителя гнильца американского — *Bacillus larvae* (White, 1906), а именно как у свежееизолированных, так и у сборных штаммов этого микроорганизма установили, что при американском гнильце в патологическом материале, кроме типичных палочек *B. larvae* встречаются также неподвижные спиралевидные формы, которые в литературе обычно описываются как фрагменты или как стадийные формы *B. larvae*. Далее установили, что эти спиралевидные формы в культуре *B. larvae* организуются в виде «веретен», размножение которых зависит от наличия палочек *B. larvae* и их «развитие и размножение» можно наблюдать на влажном желатинном агаре в чашке Петри, повернутой вверх дном в обычном микроскопе при увеличении 10 X 10. В примененной жидкой комбинированной среде эти формации распадаются на спиралевидные неподвижные формы, причем при обратной культивации на плотной среде они снова приобретают веретенообразные формы с поперечным меридианным размещением (в разном количестве). Окрасивание для доказательства наличия нуклеиновых кислот не исключает возможность, что речь идет о самостоятельных микроорганизмах, которые хотя и нельзя окрасить обычными методами окрасивания, но которые можно контрастно изобразить по методу Бурри, или же посеребрить по методу Клейна. Эти микроорганизмы хотя и удалось отделить, но без палочек *B. larvae* культуры этих микроорганизмов слабые

Pestis apium americana; *Bacillus larvae* (White, 1906); спиралевидные и веретенообразные образования в культурах *Bacillus larvae* (White, 1906)

KRIŽANOVÁ, H. — KOPPEL, Z. — HORVÁTH, J. — BESEDA, M. — HALAŠA, M. (Central State Veterinary Institute, Bratislava; University of Veterinary Medicine, Košice): Study on the Spiral and Spindle-shaped Formations in Cultures of *Bacillus larvae* (White, 1906), Causing Foul Brood in Bees. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 305-315.

The authors have been studying the bacterial diseases of the brood for a fairly long

time. American and European foul brood has been studied with the highest attention. Cultures of *Bacillus larvae* (White, 1906) were examined both in freshly isolated strains and in collection strains of this micro-organism. In cases of foul brood, the pathological material was found to contain not only the typical rods of *B. larvae* but also immobile spiral forms which are usually referred to in literature as fragments or developmental forms of *B. larvae*. These spiral forms were found to constitute spindle-shaped formations in the culture of *B. larvae*; the multiplication of these spindles depends on the presence of the rods of *B. larvae* and their development and reproduction can be observed on wet gelatine agar in a Petri dish turned upside down under a normal microscope (10 × 10 magnification). In the combined liquid medium, used in the experiments, these formations disintegrate into immobile spirals; if re-cultivated on a solid medium they re-assume their spindle shape with transverse meridian arrangement (in different amounts). Staining for proving the presence of nucleic acids does not eliminate the possibility of these formations being separate micro-organisms which cannot be stained by current staining methods but can be represented by the contrast method according to Burri, or by silvering according to Klein. The authors succeeded to separate these micro-organisms, but without the rods of *B. larvae* the colonies of these formations are feeble.

Pestis apium americana; Bacillus larvae (White, 1906); spiral and spindle formations in cultures of *Bacillus larvae* (White, 1906)

KRIŽANOVÁ, H. — KOPPEL, Z. — HORVÁTH, J. — BESEDA, M. — HALAŠA, M. (Staatliche Veterinärzentranstalt, Bratislava; Veterinärmedizinische Hochschule, Košice): *Studium der spiralförmigen und spindelförmigen Gebilde in Kulturen des Bacillus larvae* (White, 1906) — des Urhebers der Bienenfaulbrut. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 305-315.

Die Autoren befassten sich bereits längere Zeit mit dem Studium bakterieller Erkrankungen der Bienenbrut, vor allem der bösartigen (amerikanischen) und der gutartigen (europäischen) Faulbrut. Bei den Untersuchungen der Kulturen des Urhebers der bösartigen Faulbrut — des *Bacillus larvae* (White, 1906), und zwar sowohl bei frisch isolierten, als auch bei Sammlungsstämmen dieses Mikroorganismus, wurde festgestellt, daß bei dieser Erkrankung der Bienenbrut im pathologischen Material außer den typischen *Bacillus-larvae*-Stäbchen auch unbewegliche spiralförmige Formen, die in der Literatur in der Regel als Fragmente oder Entwicklungsformen von *B. larvae* beschrieben werden, auftreten. Die Verfasser stellten ferner fest, daß sich diese Spiralformen in der *B.-larvae*-Kultur in spindelförmige Gebilde organisieren, deren Vermehrung von der Anwesenheit der *Bacillus-larvae*-Stäbchen abhängig ist. Die Entwicklung und Vermehrung dieser Gebilde kann man in einem gewöhnlichen Mikroskop mit 10 × 10 Vergrößerung auf feuchten Gelatineagar in der mit dem Boden nach oben umgedrehten Petri-Schale beobachten. In dem benutzten flüssigen kombinierten Medium zerfallen diese Gebilde in spiralförmige unbewegliche Formen, wobei sie bei Rekultivierung auf festem Medium wiederum spindelförmige Formen mit Quermeridiananordnung (in verschiedener Menge) erlangen. Die Färbung zum Nachweis der Anwesenheit von Nukleinsäuren schließt die Möglichkeit nicht aus, daß es sich um selbstständige Mikroorganismen handelt, die sich zwar mit den laufenden Färbmethoden nicht färben lassen, die jedoch mit der Burrischen Kontrastmethode oder durch Versilbern nach Klein dargestellt werden können. Diese Mikroorganismen gelang es zwar zu trennen, jedoch ohne die *Bacillus-larvae*-Stäbchen sind diese Gebilde schwächlich.

Pestis apium americana; Bacillus larvae (White, 1906); spiral- und spindelförmige Gebilde in *B. larvae*-Kulturen (White, 1906)

Adresa autorov:

MVDr. Helena Križanová, MVDr. Jozef Horváth, MVDr. Mikuláš Beseda, MVDr. Miloš Halaša, CSc., Ústredný štátny veterinárny ústav, nábrežie arm. gen. L. Svobodu 21, 800 00 Bratislava

Doc. MVDr. Zoltán Koppel, CSc., Vysoká škola veterinárska, Komenského 71, 041 81 Košice

Výběr z přírůstků
Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTIZ
z úseku veterinární medicína

Uvedené publikace je možné si vypůjčit 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.

GLOOR, H. F. C 7.999/Suppl. 19
Untersuchungen zur Physiologie und Pathologie der Cervix uteri des Rindes.

Basel, Birkhäuser Verlag 1973. 94 s. 22 fot., 11 tab. Experientia suppl. 19. (Krávy — děloha — fyziologický výzkum / Krávy — děloha — anatomie — Krávy — nemoci — děloha — výzkum — NSR)

GOLDBECK, U. E 38.066/106
Verbesserung der Erstbesamungsergebnisse bei Rindern durch Gonadotropin-Releasing-Hormone (Gn-Rh). Inaug.-Diss. d. Tierärztl. Hochschule Hannover.

Hannover, Tierärztl. Hochschule 1976. 66 s. tab. (Hormóny — gonadotropin — releasing — jalovice — oplodnění — vztahy — výzkum — NSR — disertační práce)

MIKSCH, D. C 21.944/46
Coping with calving difficulties.

Lexington (Kentucky), U. S. Department of agric. 1976. 5 s. 4 obr. (Krávy — porod ztížený)

D 64.985/22

Management at lambing.
Edinburgh, College of agric. 1976. 20 s. 9 obr. Publication No 22. (Bahnice — porod / Jehňata novorozená — ošetřování)

WECHSUNG, E. E 32.497/868
Untersuchungen zum Mutterverhalten des Kaninchens. Inaug.-Diss. d. Tierärztl. Hochschule Hannover.

Hannover, Tierärztl. Hochschule 1974. 76 s. 6 tab. 12 obr. (Králik — březost — chování — vztahy — výzkum — NSR — disertační práce)

J. Vojenčiak, A. Ďuran

VOJENČIAK, J. — ĎURAN, A. (Vysoká škola veterinárska, Košice): *Metóda odberu arteriálnej krvi u hovädzieho dobytká*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5) : 317-319.

Je popísaná jednoduchá technika odberu arteriálnej krvi u hovädzieho dobytká punkciou *arteria iliaca externa per rectum*. Ojedinelé odbery nevyvolávajú ani lokálnu reakciu ani nenarušujú celkový stav zvierafa a dojivosti.

hovädzí dobytok; arteriálna krv; technika odberu; *arteria iliaca externa*

Odber arteriálnej krvi u hovädzieho dobytká prichádza do úvahy len v ojedinelých prípadoch špeciálneho laboratórneho rozboru. Stáva sa tak napr. pri detailnejšom výskume syntetizujúcej činnosti mliečnej žľazy a v súvislosti s tým pri sledovaní rozdielov jednotlivých zložiek medzi arteriálnou a venóznou krvou a pod.

Okrem prác zaoberajúcich sa možnosťami a technikou jednoduchého a ľahšieho odberu venózne krvi v podmienkach praxe (Schaetz, 1954; Hell, 1957; Witte, 1956 a ďalší) sme v dostupnej literatúre nenašli techniku odberu arteriálnej krvi, ktorá by umožňovala odber v bežných chovateľských podmienkach bez potreby chirurgického zákroku. Vzhľadom na doterajšie sledovania u väčšieho počtu produkčných dojníc sa chirurgické vypreparovanie vhodnej artérie (*artéria carotis communis sinistra et dextra*) ukázalo ako neúnosné pre nepriaznivý vplyv na produkciu mlieka a pre náročnosť takéhoto zákroku, ako aj pre možné komplikácie s narušením normálnych fyziologických funkcií. V neposlednej miere bola príčinou aj neochota a nesúhlas samotného chovateľa.

Periférne a menej hlboko uložené cievy ako *arteria caudalis*, *arteria facialis* a ďalšie sa ukázali ako nevhodné pre objektívne ťažkosti spojené s odberom. Uvedené okolnosti nás nútili hľadať iný, šetrnejší spôsob odberu, ktorý nenaruší bežnú prevádzku získavania mlieka. Ako vyhovujúca metóda sa ukázal odber arteriálnej krvi cez stenu konečníka, a to z kaudálnej časti brušnej aorty pred jej rozvetvením na jednotlivé vetvy, resp. priamou punkciou týchto vetiev.

MATERIÁL A METÓDA

Na predbežné overenie načrtnutej metódy odberu arteriálnej krvi sme použili tri kravy určené na nutnú porážku priamo na bitútku. Ďalšie pokusné odbery sme robili u ôsmich kusov normálnych jatočných zvierat s vyšetrovaním druhý deň po zabíí. Nakoľko boli výsledky sľubné, nasledujúce odbery sme robili už v vyradených dojníc v dokme v poľnohospodárskom podniku (sedem kusov), kde sme súčasne sledovali klinický stav a prípadnú reakciu zvierat na zákrok po dobu 21 dní.

Keďže sa ani v jednom prípade nevyskytli komplikácie a poruchy zdravotného stavu, urobili sme odber s rovnakým efektom aj u ďalších piatich produkčných dojníc.

TECHNIKA ODBERU

Po bežnej fixácii zvierata sa rovnako ako pri rektálnom vyšetrení vyprázdni obsah *ampula recti* a urobí sa výplach teplou vodou. Palpáciou, okrem kaudálneho konca brušnej aorty v mieste jej rozdelenia na jednotlivé vetvy, možno veľmi dobre vyhmatať v dutine panvovej dorzálnu uloženú, pulzujúcu *a. caudalis* na začiatku koreňa chvosta. Po stranách prebiehajú *arteria iliaca externa et interna*. Ako najvhodnejšia sa ukázala *a. iliaca externa* pre pomerne pevný podklad ventrolaterálnej plochy dutiny panvovej, kaudálne uloženie a dostatočný lumen.

Na znecitlivenie sliznice konečníka sme použili 5 až 10% vodný roztok Procainium chloratum, ktorý sme vpravili do konečníka hadičkou upevnenou na 50ml striekačke v množstve 100 až 150 ml. Kruhovým pohybom tampónu s anestetikom po sliznici konečníka, tiež smerom kraniálnym, docielime to, že sa stratia rušivé peristaltické vlny svaloviny konečníka a prípadná reakcia zvierata na vpich ihly. Cca po piatich minútach robíme vlastnú punkciu *a. iliaca externa* stredne hrubou injekčnou ihlou (rekord č. 12), pripojenou na infúznú hadičku, za súčasného fixovania cievy tou istou rukou. Pred punkciou vytrieme sliznicu tampónom s obsahom ajatínu.

Pri správnom vpichu krv ihneď postupuje infúznou hadičkou a pod rukou vyteká dostatočne rýchlo von, takže nehrozí koagulácia. Množstvo odobranej krvi nie je limitované.

Pri náhlom pohybe zvierata do strany môže dôjsť k povytiahnutiu ihly z artérie, preto treba takýmto pohybom zabrániť. Obyčajne postačí, ak pomocník pridrží zviera rukou a súčasne fixuje chvost z voľnej strany dojnice. Viacnásobná punkcia artérie môže mať za následok, že do dutiny panvovej sa dostane väčšie množstvo krvi z poranenej cievy, čo by mohlo vyvolať eventuálnu komplikáciu.

Literatúra

- HELL, K. A.: Zur Blutentnahme beim Rind. Dtsch. tierärztl. Wschr., 64, 1957, s. 592-594.
SCHAETZ, F.: Ein einfaches Blutentnahmegerät für die Praxis. Tierärztl. Umsch., 9, 1954, s. 9-10.
WITTE, J.: Beitrag zur Blutentnahme beim Rind. Tierärztl. Umsch., 13, 1958, s. 395-397.

Došlo dňa 10. 11. 1977

ВОЕНЧИК, И. — ДЮРАН, А. (Ветеринарный институт, Кошице): Метод взятия артериальной крови у крупного рогатого скота. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5): 317-319.

Описана простая техника взятия артериальной крови у крупного рогатого скота с помощью пункции *Arteria iliaca externa per rectum*. Одиночные взятия не вызывают ни локальной реакции, ни расстройства общего состояния животных или удоиности.

крупный рогатый скот; артериальная кровь; техника взятия; *Arteria iliaca externa*

VOJENČIAK, J. — DURAN, A. (University of Veterinary Medicine, Košice): *A Method of Collecting Arterial Blood in Cattle*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5): 317-319.

A simple method of collecting arterial blood in cattle by puncture of the *arteria iliaca externa per rectum* is described. Individual collections do not induce any local reaction nor do they impair the overall condition and milk yield of the animals.

cattle; arterial blood; method of collection; *arteria iliaca externa*

VOJENČIAK, J. — DURAN, A. (Veterinärmedizinische Hochschule, Košice): *Methode der Entnahme des Schlagaderblutes bei Rindern*. Vet. Med., Praha, 23, 1978 (5): 317-319.

Beschrieben ist die einfache Technik der Entnahme des Schlagaderblutes bei Rindern durch Punktion von *Arteria iliaca externa per rectum*. Die Einzelentnahmen rufen weder eine lokale Reaktion hervor noch stören den Zustand der Tiere und deren Milchleistung.

Rinder; Schlagaderblut; Entnahmetechnik; *Arteria iliaca externa*

Adresa autorov:

MVDr. Július Vojenčiak, CSc., MVDr. Augustín Ďuran, Vysoká škola veterinárska, Komenského 73, 041 81 Košice

Upozorňujeme čtenáře na publikaci

METODY STUDIA CHROMOZÓMŮ SAVCŮ A PTÁKŮ

[autoři L. Lojda a V. Srb]

kteřá právě vyšla v řadě Studijní informace, základní vědy v zemědělství, jako číslo 3/77.

Práce podává přehled metod užívaných při studiu chromozómů savců a ptáků a uvádí i základní údaje o chromozomálních aberacích. Samostatná kapitola je věnována chromozomální patologii skotu jako hlavnímu druhu domácích zvířat. Další část uvádí etiologické vlivy způsobující chromozomální úchyly a studii uzavírá kapitola o evolučních změnách v karyotypu.

Publikace je vhodná pro základní orientaci ve veterinární a živočišné cytogenetice s přihlédnutím k problematice veterinární genetiky a kontroly dědičnosti zdraví. Je možné ji využít i jako studijní pomůcky pro příslušné vysoké školy.

Objednávky přijímá :

Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství
odbyt a propagace

Slezská 7

120 56 P r a h a 2

Chloupková V., Pavlasová M., Ingr I., Rejholec J.: Vliv diet s přísávkou kafilérnych tukú na mléčnou užítkovost a na obsah vitamínu E v mléce dojnic	257
Mazurová J., Jiránek E., Selinger P., Doubravová L., Dvořáková V.: Diagnostika vibriózy u býků na plemenářských stanicích lavážemi umělé vagíny	267
Zajíček D.: Srovnání efektivity dvou kvantitativních ovoskopických metod	275
Borošková Z., Benková M.: Efektivnost antigenů z různých vývinových stádií <i>Ascaris suum</i> při důkaze migrační fáze experimentální askariózy u ošípaných	283
Žuffa A., Chumchal R.: Imunofluorescencia s vírusom PI-3 — štúdium rozdielnych pracovných podmienok detekcie vírusovej infekcie imunofluorescenciou na viacerých druhoch bunkových kultúr	289
Křižanová H., Koppel Z., Horváth J., Beseda M., Halaša M.: Štúdium špirálovitých a vretienkovitých útvarů v kultúrach <i>Bacillus larvae</i> (White, 1906), původcu moru včelieho plodu	305
Vojenčíak J., Duran A.: Metóda odberu arteriálnej krvi u hovädzieho dobytká	317

СОДЕРЖАНИЕ

Хлоупкова В., Павласова М., Ингр И., Рейголец Й.: Влияние диет с добавкой кафилерных жиров на молочную продуктивность и содержание витамина Е в молоке коров	257
Мазурова Я., Йиранек Е., Селингер П., Дубравова Л., Дворжакова В.: Диагностика вибриоза у быков на племяниях с помощью лаважей искусственных маток	267
Заичек Д.: Сравнение эффективности двух количественных ovosкопических методов	275
Борошкова З., Бенкова М.: Эффективность антигенов в разные стадии развития <i>Ascaris suum</i> при доказательстве миграционной фазы экспериментального аскаридоза у свиней	283
Жуффа А., Хумхал Р.: Иммунофлюоресценция вирусом PI-3 — изучение разных рабочих условий детектирования вирусной инфекции путем флюоресценции на нескольких видах клеточных культур	289
Крижанова Г., Коппел З., Горват Й., Беседá М., Галаша М.: Изучение спиральных и веретенообразных образований в культурах <i>Bacillus larvae</i> (White, 1906), возбудителя чумы пчелиной детки	305
Военчиак Й., Дюран А.: Метод взятия артериальной крови у крупного рогатого скота	317

CONTENTS

Chloupková V., Pavlasová M., Ingr I., Rejholec J.: The Effect of Diets Containing Rendering-plant Fats on Milk Efficiency and on the Content of Vitamin E in the Milk of Dairy Cows	257
Mazurová J., Jiránek E., Selinger P., Doubravová L., Dvořáková V.: Diagnostics of Vibriosis in Bulls on Breeding Stations by Lavages of the Artificial Vagina	267
Zajíček D.: Comparison of Efficiency of Two Quantitative Ovoscopical Methods	275
Borošková Z., Benková M.: The Efficiency of Antigens from Different Stages of <i>Ascaris suum</i> Development in the Proof of the Migration Phase of Experimental Ascariasis in Pigs	283
Žuffa A., Chumchal R.: Immunofluorescence with Virus PI-3 — Investigation of Different Working Conditions of Detection of Virus Infection by Immunofluorescence on Several Kinds of Cell Cultures	289
Křižanová H., Koppel Z., Horváth J., Beseda M., Halaša M.: Study on the Spiral and Spindle-shaped Formations in Cultures of <i>Bacillus larvae</i> (White, 1906), Causing Foul Brood in Bees	305
Vojenčíak J., Duran A.: A Method of Collecting Arterial Blood in Cattle	317

INHALT

Chloupková V., Pavlasová M., Ingr I., Rejholec J.: Einfluß der Diäten mit Zusatz von Abfallfett auf Milchleistung und Gehalt der Kuhmilch an Vitamin E	257
Mazurová J., Jiránek E., Selinger P., Doubravová L., Dvořáková V.: Die Vibriosebestimmung bei Bullen in Zuchtstationen durch Lavagen der künstlichen Vagina	267
Zajíček D.: Der Effektivitätsvergleich von zwei quantitativen ovoskopischen Methoden	275
Borošková Z., Benková M.: Die Effektivität der Antigene aus verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>Ascaris suum</i> bei einem gleichzeitigen Nachweis der Migrationsphase der experimentalen Askaridose bei Schweinen	283
Žuffa A., Chumchal R.: Die Immunofluoreszenz durch PI-3-Virus und Studium unterschiedlicher Arbeitsbedingungen zur Detektion der virusbedingten Infektion durch Immunofluoreszenz an mehreren Arten von Zellenkulturen	289
Křižanová H., Koppel Z., Horváth J., Beseda M., Halaša M.: Studium der spiralförmigen und spindelförmigen Gebilde in Kulturen des <i>Bacillus larvae</i> (White, 1906) — des Urhebers der Bienenfaulbrut	305
Vojenčiak J., Ďuran A.: Methode der Entnahme des Schlagaderblutes bei Rindern	317