

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

12

ROČNÍK 26 (LIV)
PRAHA
PROSINEC 1981
CENA 10 Kčs
CS ISSN 0590-5214

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Rídí 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, DrSc.

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

Redaktorka ing. Jovanka Václavíčková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1981

■

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozborů 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 257541. Celoroční předplatné Kčs 120,—.

■

Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзоры, анализы и научные статьи о решенных задачах по научному исследованию в области ветеринарии. Издает 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, 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.

DETEKCE VIRŮ PI-3, BVD-MD A PARVOVIRU, PERSISTUJÍCÍCH V BOVINNÍCH FĚTECH PO EXPERIMENTÁLNÍ INTRAUTERINNÍ INFEKCI

J. Menšík, Z. Pospíšil, V. Rozkošný, M. Machatková, J. Machatý Z. Vlček

MENŠÍK, J. — POSPÍŠIL, Z. — ROZKOŠNÝ, V. — MACHATKOVÁ, M. — MACHATÝ, J. — VLČEK, Z. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Vysoká škola veterinární, Brno): *Detekce virů PI-3, BVD-MD a parvoviru, persistujících v bovinních fětech po experimentální intrauterinní infekci*. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 701-707.

Rostoucí orgánové kultury připravené z fětů experimentálně infikovaných *in utero* virem PI-3, BVD-MD nebo parvovirem skotu se osvědčily v pokusech o reizolaci těchto virů za 7, 14, 21, 35, 42 a 70 dní po infekci. Pokusy o jejich průkaz klasickým způsobem inokulace primární buněčné kultury fetálních ledvin byly úspěšné jen při reizolaci viru PI-3 za sedm dní po infekci. V primární buněčné kultuře připravené ze sleziny, plic, ledvin a varlat fětů vyba-vených za sedm dní po infekci byl prokázán virus PI-3 bez tvorby cytopatic-kého efektu. Ten se vytvořil po přesazení buněk v první pasáži, kdy došlo k dalšímu pomnožení viru.

hovězí fěty; intrauterinní infekce; orgánové kultury; persistentní infekce

K prvnímu setkání hovězího fětu s virovým antigenem dochází po infekci vnímavé březí krávy virem IBR, PI-3, BVD-MD, popřípadě dalšími viry, nebo po vakcinaci živými virovými vakcínami (Kennedy a Richards, 1964; Mc Kercher a Wada, 1964; Kahrs, aj. 1970; Scott, 1973; Dunne aj., 1973; Bittle a House, 1973). Výsledek této intrauterinní infekce závisí na stáří plodu a na vlastnostech viru. Častým důsledkem virové infekce v první třetině březosti, kdy ještě nezačala tvorba protilátek, jsou aborty a fetální malformace (Kahrs, 1968; Kahrs aj., 1971), zatímco viry s nižší patogenitou (i když infikují fětus v raném období gestace) mají tendenci persistovat ve fetálních tkáních dlouhou dobu, stejně tak jako viry patogenní, proniknou-li do fětu ve druhé polovině březosti.

Občasné neúspěchy kultivace primárních fetálních buněčných kultur z mladých telat nebo hovězích fětů mohou být v některých případech způsobeny přítomností latentního viru, který má v podmínkách *in vitro* lepší možnosti k pomnožování. Jeho izolace z fetálních tkání na buněčných kulturách klasickým postupem není vždy snadná, protože protilátky přítomné v orgánech a tkáních neutralizují virus v suspenzi ještě před inokulací buněčné kultury (Dunne aj., 1973). Citlivější metodou k průkazu některých virů jsou orgánové kultury (Tyrrel a Byn- de, 1966; Tyrrel a Hoorn, 1965; Harnett a Hooper, 1968;

Schaff aj., 1971]. Ještě citlivější je však kultivace orgánových fragmentů připravených přímo z tkání infikovaných zvířat [Machatková aj., 1981; Menšík aj., 1975].

MATERIÁL A METODY

INFEKCE FÉTŮ

Fěty byly infikovány *in utero* virem PI-3, BVD-MD a parvovirem, které byly inokulovány březím krávám ve čtvrtém až devátém měsíci gravidity *intra venam* nebo do amniotického vaku po předchozí laparotomii.

VIROVÉ KMENY

- virus BVD-MD, kmen Oregon, pomnožený na primárních buněčných kulturách fetálních bovinních ledvin v dávce 5×10^6 TKID₅₀;
- virus PI-3 vakcinační, pro telata nepatogenní kmen (Bioveta Nitra) v dávce $5 \times 10^{7.5}$ TKID₅₀;
- bovinní parvovirus, kmen HADEN, ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů na VÚVeL v Brně v dávce $5 \times 10^{5.5}$ TKID₅₀.

VYBAVENÍ PLODŮ A JEJICH ZPRACOVÁNÍ

Za 7 až 70 dní po infekci byly plody vybaveny hysterektomií po předchozím porážení krávy. Z fetálních orgánů byly asepticky odebrány vzorky tkání, které byly použity pro přípravu buněčných a explantátových kultur.

PRIMÁRNÍ KULTURY

Primární buněčné kultury byly připraveny z plic, ledvin, sleziny a varlat standardní trypsinací metodou, modifikovanou podle druhu a charakteru tkáně. Trypsinace plic, ledvin, varlat probíhala při teplotě 37 °C v 0,10 až 0,20% roztoku trypsinu v 0,01% roztoku verzenu. Buňky uvolňované stálým mícháním fragmentů při 300 otáčkách za minutu byly získávány v 20minutových intervalech. Buněčná suspenze fetální bovinní sleziny byla připravena trypsinací technikou založenou na stacionární trypsinaci probíhající při teplotě 37 °C v 0,20% trypsinu a uvolňování buněk mícháním v pufovaném fyziologickém roztoku. Obě fáze byly střídány podle denzity buněčné suspenze (Machatková aj., 1981). Pro přípravu primárních buněk z fetální bovinní nosní sliznice byla použita metoda popsaná Machatkovou a Pospíšilem (1975). Buněčné suspenze byly nasazovány do kultivačního média Parker (TM-Sevac II), doplněného o 10 % bovinního fetálního séra, antibiotika a kyselý uhličitán sodný (NaHCO₃) na pH 6,8–6,9.

ORGÁNOVÉ KULTURY

Rostoucí orgánové kultury byly připraveny podle metodiky popsané Machatkovou aj. (1974, 1981) a kultivovány v médiu EPL (TM Sevac III), obohaceném o 10 % fetálního séra, glutamin a neesenciální aminokyseliny. Vzorky média byly odebírány ve dvoudenních až třídnenních intervalech a uloženy při teplotě –60 °C až do vyšetření.

IZOLACE A IDENTIFIKACE VIRŮ

K pokusům o izolaci viru z infikovaných fétů byla použita jednak klasická metoda inokulace orgánové suspenze na buněčné kultury primárních bovinních fetálních ledvin, připravených ze zdravých fétů, jednak byl virus prokázován přímo ve tkáních infikovaných fétů, kultivovaných jako rostoucí orgánové kultury nebo zpracovaných a kultivovaných jako primární buněčné kultury. V médiu orgánových kultur byl virus prokázován inokulací na primární buněčné kultury fetálních ledvin.

Při pokusech o izolaci viru z infikovaných fétů, uskutečněných klasickou technikou inokulace orgánové suspenze na buněčnou kulturu primárních bovinních fetálních ledvin, se podařilo izolovat virus PI-3 jen z plic tří fétů (5, 6, 7), vybavených za sedm dní po intrauterinní infekci, zatímco pomocí rostoucích orgánových kultur byl virus PI-3 prokázán ve slezině, plicích a thymu fétu č. 5, v plicích a slezině fétu č. 6 a v plicích, slezině, ledvinách, thymu a varlatech fétu č. 7. Pokusy o záchyt viru PI-3 na buněčných kulturách z fétů vybavených za 35 až 72 dní po infekci nebyly úspěšné. Naproti tomu však média z rostoucích orgánových kultur těchto fétů vykazovala hemaglutinační aktivitu a po inokulaci na běžně připravované buněčné kultury bylo pozorováno velké množství intracytoplasmatických inkluzí, byla prokázána hemadsorbce a hemaglutinace a virus PI-3 byl identifikován imunofluorescenčním vyšetřením. Tímto postupem byl prokázán persistující virus v thyreoidei, slezině, ledvinách a varlatech fétu č. 3 vybaveného za 35 dní po infekci a v thyreoidei, slezině, thymu a ledvinách fétu č. 1 dokonce ještě za 70 dní po infekci (tab. I).

Podobně byl v orgánových kulturách prokázán virus BVD-MD, který byl fétům č. 1 a 2 aplikován 42 a 14 dní před jejich vybavením. Úspěšný byl i průkaz parvoviru v orgánové kultuře thymu, plic a sleziny z fétu č. 9 za 21 den po infekci (tab. I).

Průkaz viru PI-3, BVD-MD a parvoviru pomocí rostoucích orgánových kultur připravených z tkání fétů infikovaných *in utero* byl tedy

I. Průkaz viru v rostoucích orgánových kulturách z infikovaných fétů a technikou inokulace suspenze orgánů na primární buněčné kultury — Demonstration of the virus in the growing organ cultures from infected foetuses and demonstration by the method of the inoculation of organ suspension to primary cell cultures

Fétus č.	Infekce fétu		Použitý virus	Vybavení fétu za dní p. i.	Průkaz viru	
	stáří	způsob			v orgánové kultuře*	inokulací
1	200	matka	PI-3	70	TD, SI, TM, LE, PI	neg.
	228		BVD	42	TD, SI, TM, LE, PI	neg.
2	256	matka	BVD	14	TD, PI, SI, TM	neg.
3	115	fétus	PI-3	35	TD, LE, VA, SI	neg.
4	129	matka	BVD	21	neg.	neg.
5	113	fétus	PI-3	7	SI, PI, TM	+ (P1)
6	113	fétus	PI-3	7	PI, SI	+ (P1)
7	173	fétus	PI-3	7	PI, SI, LE, TM, VA	+ (P1)
8	240	matka	BVD	30	neg.	neg.
9	249	matka	BVD + + PARVO	21	BVD : neg. PARVO : TM, PI, SI	neg.

* TD — thyreoidea
SI — slezina
TM — thymus

LE — ledvina
PI — plíce
VA — varlata

mnohem spolehlivější než klasickým postupem inokulace testovaných orgánových suspenzí na primární buněčnou kulturu fetálních ledvin. Ve většině případů byly rovněž neúspěšné pokusy o jejich detekci v buněčných kulturách připravených přímo z orgánů a tkání těchto fétů. Jen v buněčných kulturách z fétů č. 5 a 7, vybavených za sedm dní po infekci virem PI-3, byl virus identifikován: v primární buněčné kultuře plic a ledvin z fétu č. 5 za sedm a devět dní po založení kultury a v primární buněčné kultuře plic a varlat fétu č. 7 za sedm, resp. osm dní po založení kultury, v obou případech bez tvorby cytopatického efektu (tab. II). K výraznějšímu pomnožení viru došlo pak při založení subpasáže primární buněčné kultury z fétu č. 7. Virus byl identifikován hemaglutinací a hemadsorbci v sekundárních buněčných kulturách plic, varlat, sleziny a ledvin po třech dnech kultivace, kdy se již začal objevovat charakteristický cytopatický efekt. Nejvyšší hemaglutinační titer byl zjištěn v sekundární buněčné kultuře sleziny (tab. II).

II. Průkaz viru PI-3 v primárních buněčných kulturách ze dvou fétů vybavených za sedm dní po experimentální infekci *in utero* — Demonstration of the PI-3 virus in primary cell cultures from two fetuses delivered seven days after experimental infection *in utero*

Fétus č.	Orgán	HA titer za dny kultivace				Subkultura tři dny po přesazení
		3	7	8	9	
7	slezina	neg.	neg.	neg.	neg.	512
	plíce	neg.	neg.	8	neg.	16
	ledvina	neg.	neg.	neg.	neg.	16
	varlata	neg.	16	8	neg.	16
5	plíce	neg.	16	NT	128	NT
	ledvina	neg.	32	NT	128	NT

DISKUSE

Výsledky této práce potvrdily, že technika orgánových kultur je vhodnou a velmi citlivou metodou pro detekci virů obtížně prokazatelných jinými metodami. Byla již dříve uplatněna v pokusech o diagnostiku akutních respiračních onemocnění lidí a osvědčila se při izolaci rhinovirů (Harnett a Hooper, 1968; Votava a Tyrrell, 1970), enterovirů, picornavirů a myxovirů (Schaff aj., 1971), paramyxovirů, adenovirů a herpesvirů (Roome aj., 1971). Také bovinní rhinovirus se podařilo kultivovat na buněčných kulturách jen po předchozím pomnožení v orgánové kultuře (Reed aj., 1971). Jako zvlášť citlivý substrát pro izolaci bovinních respiračních virů se ukázaly orgánové kultury připravené z hovězích fétů a orgánové kultury pěstované jako rostoucí orgánové fragmenty (Machatková aj., 1974; Pospíšil aj., 1978). Velmi perspektivní je i další varianta techniky orgánových kultur připravených přímo z orgánů a tkání infikovaných a k vy-

šetření určených zvířat poražených v různých fázích rozvoje infekčního procesu (Menšík aj., 1975). Touto metodou jsme byli schopni prokázat persistující infekci hovězích fétů virem PI-3 ještě za 35 a 70 dní po infekci březí krávy, persistující infekci virem BVD-MD za 14 a 42 dny po infekci a parvovirem 21. den po infekci. Zatímco v pokusech o izolaci viru klasickým postupem inokulace primární buněčné kultury fetálních ledvin byl virus PI-3 prokázán jen v plicích fétů vybavených za sedm dní po infekci matky, byl prokázán v rostoucích fragmentech i z dalších orgánů.

Persistence viru BVD-MD u telat po experimentální infekci byla opakovaně prokázána v trachei, bronchiálních mizních uzlinách a v plicích za 56 dní (Mills a Luginbuhl, 1969) a v nosních sekretech za 103 dny (Lambert a Fornelius, 1968). Persistentní infekci fetálních orgánových kultur virem BVD-MD po dobu nejméně 35 dní popsali Ssentongo aj. (1980) a potvrdili tak i výsledky Rossiho a Kiesela (1977), že bovinní fetální tracheální explantáty podporují množení viru BVD-MD. V našich pokusech se virus BVD-MD množil v rostoucích orgánových explantátech thyreoidey, sleziny, thymu, ledvin a plic z fétů infikovaných *in utero* za 14 a 42 dny po infekci.

Reizolace bovinního parvoviru v orgánové kultuře z thymu, plic a sleziny za 21 den po infekci březí matky potvrzuje výsledky Storzovy aj. (1978), že tento virus může mít podobný patogenní potenciál u skotu jako parvovirus prasat, popřípadě parvoviry u jiných druhů zvířat (Redman aj., 1974; Csiza aj., 1971; Kilham a Margolius, 1966; Toolan, 1960).

Je zřejmé, že rostoucí tkáňové fragmenty jsou ve srovnání s buněčnými kulturami vnímavějším substrátem, umožňujícím průkaz i malých kvant viru.

Vysoká citlivost tohoto kultivačního systému může být spojována se zachováním částečné stability původních intracelulárních vztahů a určitých specializovaných buněčných typů. Pravděpodobnost detekce virové infekce může však zvyšovat i přítomnost proliferujících dediferencovaných buněk spolu s možností jejich dlouhodobé kultivace.

Literatura

- BITTLE, J. L. — HOUSE, J. A. Comments on bovine viral diarrhoea vaccine reactions. J. Am. vet. med. Ass., 163, 1973, s. 878-879.
CSIZA, C. K. — SCOTT, F. W. — DE LAHUNTA, A.: Feline viruses. XIV. Transplacental infections in spontaneous panleucopenia of cats. Cornell Vet., 61, 1971, s. 423-439.
DUNNE, H. W. — AJINKYA, S. M. — BUBASH, G. R. — GRIEL, L. C.: Para-influenza-3 and bovine enteroviruses as possible important causative factors in bovine abortion. Am. J. vet. Res., 34, 1973, s. 1121-1126.
HARNETT, G. B. — HOOPER, W. L.: Test-tube organ cultures of ciliated epithelium for isolation of respiratory viruses. Lancet, 11, 1968, s. 339-340.
KAHRS, R. F.: The relationship of bovine viral diarrhoea-mucosal disease to abortion in cattle. J. Am. vet. med. Ass., 153, 1968, s. 1652-1656.
KAHRS, R. F. — BARTHOLOMEW, R. — HOUSE, J. A. — WARD, G. M.: Epidemiological investigation of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in an unvaccinated dairy herd. A case report. Cornell Vet., 80, 1970, s. 16-18.
KAHRS, R. F. — SCOTT, F. W. — DE LAHUNTA, A.: Bovine viral diarrhoea mucosal disease abortion and congenital cerebellar hypoplasia in a dairy herd. J. Am. vet. med. Ass., 156, 1971, s. 851-857.

- KENNEDY, P. C. — RICHARDS, W. P. C.: The pathology of abortion caused by the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Pathologie vet.*, 1, 1964, s. 7-17.
- KILHAM, L. — MARGOLIUS, G.: Spontaneous hepatitis and cerebellar "hypoplasia" in suckling rats due to congenital infections with rat virus. *Am. J. Path.*, 49, 1966, s. 457-475.
- LAMBERT, G. — FERNELIUS, A. L.: Bovine viral diarrhoea virus and *Escherichia coli* in neonatal calf enteritis. *Can. J. comp. Med.*, 32, 1968, s. 440-446.
- MACHATKOVÁ, M. — MENŠÍK, J. — ROZKOŠNÝ, V.: Růst fetálních bovinních buněk po intrauterinní virové infekci plodů. *Vet. Med.*, Praha, 26, 1981, č. 9, s. 525-534.
- MACHATKOVÁ, M. — POSPÍŠIL, Z.: Biological characteristics of cell lines derived from the respiratory tract of bovine foetus. *Folia biol.*, Praha, 21, 1975, s. 117-121.
- MACHATKOVÁ, M. — POSPÍŠIL, Z. — MENŠÍK, J.: Kultivace orgánových kultur připravených z respiračního traktu telat. *Vet. Med.*, Praha, 19, 1974, s. 565-572.
- MC KERCHER, D. G. — WADA, E. M.: The virus of infectious bovine rhinotracheitis as a cause of abortion in cattle. *J. Am. vet. med. Ass.*, 144, 1964, s. 136-142.
- MENŠÍK, J. — POSPÍŠIL, Z. — SUCHÁNKOVÁ, A. — ČEPICA, A. — ROZKOŠNÝ, V. — SMÍD, B. — MACHATKOVÁ, M.: Využití komplexní virologické techniky k přímému průkazu virů PI-3 a IBR v orgánech infikovaných telat. *Vet. Med.*, Praha, 20, 1975, s. 609-622.
- MILLS, J. H. L. — LUGINBUHL, R. E.: Distribution and persistence of mucosal disease virus in experimentally-exposed calves. *Am. J. vet. Res.*, 29, 1968, s. 1367-1376.
- POSPÍŠIL, Z. — ROZKOŠNÝ, V. — MENŠÍK, J. — ČEPICA, A. — KREJČÍ, J. — MESÁROŠ, E. — SUCHÁNKOVÁ, A. — MACHATKOVÁ, M. — ŠÍŠÁK, F.: Etiologie, epizootologie a prevence hromadných virových onemocnění telat. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, 1978, 37 s.
- REDMAN, D. R. — BOHL, E. H. — FERGUSON, L. C.: Porcine parvoviruses: Natural and experimental infections of the porcine fetus and prevalence in mature swine. *Infect. Immun.*, 10, 1974, s. 718-723.
- REED, S. E. — TYRRELL, D. A. J. — BETTS, A. O. — WATT, R. G.: Studies on a rhinovirus (EC 11) derived from a calf. I. Isolation in calf tracheal organ cultures and characterisation of the virus. *J. comp. Path.*, 81, 1971, s. 33-41.
- ROOME, A. P. CH. — DICKINSON, V. — CAUL, E. O.: Simplified organ cultures of human embryo trachea in the diagnosis of viral respiratory disease of children. *J. clin. Path.*, 24, 1971, s. 487-490.
- ROSSI, C. R. — KIESEL, G. K.: Susceptibility of bovine macrophage and tracheal ring cultures to bovine viruses. *Am. J. vet. Res.*, 38, 1977, s. 1705-1708.
- SCOTT, F. W. — KAHRS, R. F. — DE LAHUNTA, A. — BROWN, T. T. — MC ENTEE, K. — GILLESPIE, J. H.: Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. I. Cerebellar degeneration (hypoplasia), ocular lesions and fetal mummification following experimental infection with bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. *Cornell Vet.*, 4, 1973, s. 536-578.
- SCHAFF, D. M. — BOSEELL, J. — MUFSON, M. A.: Viral and mycoplasmal infection in minor respiratory illnesses and non-streptococcal pharyngitis. A search for coronaviruses using fetal tracheal organ cultures. *Am. Rev. resp. Dis.*, 104, 1971, s. 41-51.
- SSENTONGO, Y. K. — CAMPBELL, R. S. F. — JOHSON, R. H.: Pathogenesis of bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD) virus infection in tracheal organ cultures. *Vet. Microbiol.*, 5, 1960, s. 257-263.
- STORZ, J. — YOUNG, S. — CARROLL, E. J. — BATES, M. S.: Parvovirus infection of the bovine fetus: Distribution of infection, antibody response, and age-related susceptibility. *Am. J. vet. Res.*, 39, 1978, s. 1099-1102.
- TOOLAN, H. W.: Experimental production of mongoloid hamsters. *Science*, 131, 1960, s. 1446-1448.
- TYRRELL, D. A. J. — BYNDE, M. L.: Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet*, 11, 1966, s. 76-84.
- TYRRELL, D. A. J. — HOORN, B.: The growth of some myxoviruses in organ cultures. *Br. J. exp. Path.*, 46, 1965, s. 514-518.
- VOTAVA, M. — TYRRELL, D. A. J.: The possible value of ceratin cells for the propagation of respiratory viruses. *Arch. ges. Virusforsch.*, 29, 1970, s. 253-256.

Došlo dne 4. 9. 1981

МЕНШИК, Я. — ПОСПИШИЛ, З. — РОЗКОШНЫ, В. — МАХАТКОВА, М. — МАХАТЫ, Й. — ВЛЧЕК, З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно; Институт ветеринарии, Брно): Детектирование вирусов PI-3, BVD-MD и парвовируса, остающихся в бовинных фетах после экспериментального интритаматочного заражения. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 701-707.

Растущие культуры органов, приготовленные из экспериментально зараженных фетов *in utero* вирусом PI-3, BVD-MD или парвовирусом крупного рогатого скота, хорошо себя оправдали в опытах с реизоляцией этих вирусов спустя 7, 14, 21, 35, 42 и 70 дней после инфекции. Попытки доказать их наличие классическим способом инокулирования первичной клеточной культуры фетальных почек оказались успешными только при реизоляции вируса PI-3 спустя 7 дней после заражения. В первичной клеточной культуре, приготовленной из селезенки, легких, почек и семенников фетов спустя 7 дней после заражения, было доказано наличие вируса PI-3 без присутствия цитопатического эффекта. Последний возник после пересадки клеток на первом пассаже, когда вирус снова размножился.

говяжьи феты; интритаматочное заражение; культуры органов; продолжающееся заражение

MENŠÍK, J. — POSPÍŠIL, Z. — ROZKOŠNÝ, V. — MACHATKOVÁ, M. — MACHATÝ, J. — VLČEK, Z. (Veterinary Research Institute, Brno; University of Veterinary Medicine, Brno): *The Detection of the PI-3 and BVD-MD Viruses and Parvovirus Persisting in Bovine Foetuses after Experimental Intrauterine Infection.* Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 701-707.

Growing organ cultures prepared from foetuses experimentally infected *in utero* by the viruses PI-3 and BVD-MD or bovine parvovirus proved to be suitable in tests with the re-isolation of these viruses 7, 14, 21, 35, 42 and 70 days after infection. The attempts at demonstrating them by the traditional method of the inoculation of the primary cell culture of foetal kidneys were successful only at the re-isolation of the PI-3 virus seven days after infection. The PI-3 virus without cytopathic effect was demonstrated in the primary cell culture prepared from the spleen, lungs, kidneys and testes of foetuses delivered seven days from infection. The cytopathic effect manifested itself after cell transplantation in the first passage when further multiplication of the virus occurred.

bovine foetuses; intrauterine infection; organ cultures; persistent infection

MENŠÍK, J. — POSPÍŠIL, Z. — ROZKOŠNÝ, V. — MACHATKOVÁ, M. — MACHATÝ, J. — VLČEK, Z. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno; Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): *Detektion der Viren PI-3, BVD-MD und des Parvovirus, die in den bovinen Feten nach der experimentellen intrauterinen Infektion persistieren.* Vet. Med., Praha, 26 1981 (12) : 701-707.

Die wachsenden Organkulturen, die aus den durch die Viren PI-3, BVD-MD oder durch das Parvovirus von Rindvieh *in utero* experimentell infizierten Feten vorbereitet wurden, bewährten sich in Versuchen um eine Reisolation dieser Viren in 7, 14, 21, 35, 42 und 70 Tagen nach der Infektion. Die Versuche um ihre Entdeckung durch die klassische Methode der Inokulation der primären Zellkultur der fetalen Nieren waren erfolgreich nur bei der Reisolation des Virus PI-3 in sieben Tagen nach der Infektion. In der primären Zellkultur, die aus Milz, Lungen, Nieren und Hoden von Feten vorbereitet wurde, die in sieben Tagen nach der Infektion herausgenommen wurden, wurde das Virus PI-3 ohne Bildung eines zytopathischen Effektes nachgewiesen. Zu diesem kam es nach der Übertragung der Zellen in der ersten Passage, da eine weitere Vermehrung des Virus entstand.

Rindfeten; intrauterine Infektion; Organkulturen; persistente Infektion

Adresa autorů:

Doc. MVDr. Jaromír Menšík, CSc., MVDr. Zdeněk Pospíšil, CSc., MVDr. V. Rozkošný, ing. Marie Machatková, MVDr. Josef Machatý, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
MVDr. Zdeněk Vlček, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

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.

FRIIS, N. F.

D 30.900/617

***Mycoplasma suis* pneumoniae and *Mycoplasma flocculare* in the growth precipitation test**

Copenhagen, Statens veterinære serumlaboratorium 1977. S. 168-175, 2 obr., 3 tab. Meddelelser fra Statens veter. serumlabor. 617. (*Mycoplasma suis* pneumoniae a *Mycoplasma flocculare* — diferenciace — metody sérologické — výzkum — Dánsko)

DARLINGTON, R. W. — WISE, W. E.

D 61.393/23

Rotavirus infections of neonatal (newborn) animals

Frankfort, University of Kentucky (1979). Nestr. VET 23. (Telata, selata a hříbata — nemoci střevní — průjem — diagnóza)

Facts about atrophic rhinitis

C 22.758

Omaha (Nebraska), Chromalloy animal health division (1980). Nestr., obr., tab. (Prase — nemoci nakažlivé — sípavka — vakcinace)

Streptococcal meningitis in pigs

E 19.689/752

Pinner, Ministry of agriculture, fisheries and food 1980. 2 s. Leaflet 752. (Meningitida — prase — *Streptococcus suis*-typ 2 — diagnóza — léčení)

Brucellosis

D 70.432/145

Questions and answers.

Washington, USDA 1978. 12 s. (Brucelóza — hospodářská zvířata — diagnóza, ochrana a léčení)

C 26.485/1975/66

The epizootic of swine foot-and-mouth diseases in Britany, in the spring of 1974

Lyon, École nationale vétérinaire 1975. 38 s., obr., tab. Thèse École nat. vétér. de Lyon, Année 1975, no 66. (Slintavka a kulhavka — prase — Francie — výzkum)

MULTIPLIKACE VIRŮ IBR, PI-3 A BVD-MD V BUNĚČNÝCH A ORGÁNOVÝCH KULTURÁCH PŘIPRAVENÝCH Z HOVĚZÍCH FĚTŮ PO EXPERIMENTÁLNÍ INTRAUTERINNÍ INFEKCI

J. Menšík, Z. Pospíšil, V. Rozkošný, M. Machatková, J. Machatý, Z. Vlček

MENŠÍK, J. — POSPÍŠIL, Z. — ROZKOŠNÝ, V. — MACHATKOVÁ, M. — MACHATÝ, J. — VLČEK, Z. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Vysoká škola veterinární, Brno): *Multiplikace virů IBR, PI-3 a BVD-MD v buněčných a orgánových kulturách připravených z hovězích fětů po experimentální intrauterinní infekci*. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 709-719.

Intrauterinní infekce čtyřměsíčních až devítiměsíčních hovězích fětů virem PI-3, BVD-MD a parvovirem skotu, uskutečněná 7 až 12 dní před jejich vybavením, neovlivnila výrazněji vnímavost primárních buněčných kultur připravených z jejich orgánů a tkání k další virové infekci *in vitro*. Virus BVD-MD a virus IBR se množily v primárních buněčných kulturách v orgánů fétu infikovaného virem PI-3 sedm dní před vybavením, a to i v přítomnosti endogenního viru PI-3. Persistující infekce virem PI-3 neovlivnila ani vnímavost fetálních orgánových kultur k infekci virem IBR a PI-3 *in vitro*. Virus IBR a endogenní virus PI-3 se v orgánových kulturách thymu a plic množily do vysokých titrů současně, zatímco v orgánových kulturách ledvin, sleziny a varlat byla multiplikace endogenního viru PI-3 potlačena.

buněčné kultury; orgánové kultury; persistentní infekce; kombinované infekce

Na možnost výskytu různých virů ve fetálních tkáních poukazují nálezy imunoglobulinů a specifických protilátek v krvi novorozených telat (Franz aj., 1974; Horyna aj., 1980; Čepica aj., 1977; Pospíšil aj., 1979a) a informace o kontaminaci hovězího fetálního séra a fetálních buněčných kultur (Rossi aj., 1980; Nuttall aj., 1979; Hubbert aj., 1973). Prací, které se zabývají latentní infekcí telecí nebo fetálních tkání používaných k přípravě buněčných a orgánových kultur pro virologickou diagnostiku, je však v současném písemnictví jen málo (Gavrilov, 1972; Michajlova aj., 1977; Jankevič a Drejsin, 1977). Latentní intrauterinní infekci fětů vyvolávají i málo patogenní viry v první třetině březosti nebo patogenní viry v druhé polovině gravidity, které mohou dlouhodobě persistovat ve fetálních orgánech a tkáních a indukovat tvorbu protilátek (Pospíšil aj., 1979b). Tato aktivní imunita je pak po narození telete ještě potenciována pasivní imunitou kolostrální a ke klinické manifestaci infekce v postnatálním období telete dochází zpravidla teprve v důsledku interkurentně probíhajícího onemocnění, nebo při oslabení organismu působením jiných nepříznivých vlivů (Menšík aj., 1976; Gratzek aj., 1966; McKercher, 1968; York, 1968).

Použití orgánových a buněčných kultur z telat nebo fětů latentně infikovaných může v některých případech ovlivnit výsledky virologické diagnostiky. Předložená práce shrnuje výsledky pokusů o vyvolání persistentní infekce hovězích fětů virem PI-3, BVD-MD a parvovirem a pokusů o vnímavosti buněčných a orgánových kultur připravených z těchto fětů k další virové infekci *in vitro*.

MATERIÁL A METODA

EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE

K pokusům použité krávy nebo jalovice ve čtvrtém až devátém měsíci gravidity byly infikovány virem PI-3, BVD-MD nebo parvovirem skotu *intra venam*, nebo přímo do amniotického vaku vpichem přes stěnu děložní po předchozí laparotomii. Metody přípravy buněčných a orgánových kultur z infikovaných a kontrolních neinfikovaných fětů byly popsány v předchozím sdělení (Menšík aj., 1981).

INFEKCE BUNĚČNÝCH A ORGÁNOVÝCH KULTUR

Primární buněčné kultury plic, ledvin, sleziny a varlat, připravené z infikovaných a kontrolních fětů a narostlé ve zkumavkách, byly inokulovány virem IBR, PI-3 a BVD-MD. Část zkumavkových kultur z každého druhu buněk zůstala neočkována. Množství pomnoženého viru bylo zjišťováno v médiu ze čtyř inokulovaných zkumavek, sklizeného po nástupu typického cytopatického efektu titrací na primárních buněčných kulturách fetálních ledvin ve zkumavkách. V indikovaných případech, kdy některé buněčné kultury ve zkumavkách vykazovaly pozitivní hemaglutinaci, nebo u nichž se dala předpokládat přítomnost latentního viru, byly z příslušné buněčné kultury v RU lahvičky založeny sekundární kultury ve zkumavkách.

Orgánové kultury z thyreoidey, plic, trachey, sleziny, ledvin a thymu byly inokulovány virem IBR a PI-3 a jejich pomnožení bylo kontrolováno titrací média sklizeného z orgánových kultur za různé dlouhou dobu po inokulaci na buněčných kulturách fetálních ledvin ve zkumavkách. Izolované viry byly pak identifikovány imunofluorescencí, testem inhibice hemaglutinace a virusneutralizačním testem s příslušnými antiséry.

VÝSLEDKY

MNOŽENÍ VIRŮ IBR, BVD-MD A PI-3 NA FETÁLNÍCH BUNĚČNÝCH KULTURÁCH

Srovnávací pokusy ukázaly, že buněčné kultury připravené z orgánů a tkání čtyřměsíčních až devítiměsíčních neinfikovaných fětů jsou přibližně stejně vnímavé k infekci všemi testovanými viry. Pokud se vyskytly rozdíly, byly neprůkazné. Výraznější rozdíly nebyly zjištěny ani ve vnímavosti buněčných kultur připravených ze stejně starých fětů infikovaných a neinfikovaných (tab. I).

Viry BVD-MD a IBR se množily s tvorbou charakteristického cytopatického efektu i v primárních buněčných kulturách latentně infikovaných virem PI-3 (tab. II), které byly připraveny z fětů č. 5 a 7 vybaivených za sedm dní po infekci *in utero*. Současně s inokulovanými viry BVD-MD a IBR se v primárních buněčných kulturách pomnožil i virus PI-3 (tab. III). Charakteristický cytopatický efekt pro virus PI-3 současně s produkcí hemaglutininu se vytvořil po superinfekci primárních buněk, sleziny, plic, ledvin a varlat virem PI-3 (tab. IV).

I. Vnímavost fetálních buněčných kultur připravených z fétů infikovaných *in utero* a fétů kontrolních k virové infekci (IBR a PI-3) *in vitro* — The susceptibility of foetal cell cultures prepared from foetuses infected *in utero* and from control foetuses, to virus infection (IBR and PI-3) *in vitro*

Fetus č.	Stáří v den infekce	Druh infekce	Dny p. i.	Detekce persistujícího viru v orgánové kultuře	Titř viru v buněčné kultuře ⁺							
					Le		Sl		Pl		Va	
					IBR	PI-3	IBR	PI-3	IBR	PI-3	IBR	PI-3
6	113	PI-3	7	Pl, Sl	10 ⁵	10 ⁵	NT	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁴	NT	10 ⁴
11	125	kontrola	—	neg.	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁴
3	115	PI-3	35	Td, Le, Va, Sl	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁵	10 ²	NT	10 ³	10 ⁶	NT
12	146	kontrola	—	—	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁶	10 ³
1	200	PI-3	70	Td, Sl, Tm, Le, Pl	10 ⁵	10 ²	10 ⁵	10 ²	10 ³	10 ³	10 ⁵	NT
	228	BVD	42	Td, Sl, Tm, Le, Pl	10 ⁵	10 ²	10 ⁵	10 ²	10 ³	10 ³	10 ⁵	NT
2	256	BVD	14	Td, Pl, Sl, Tm	10 ⁵	10 ³	10 ⁵	10 ²	10 ⁵	10 ³	10 ⁵	NT
9	249	BVD parvo	21	neg. Tm, Pl, Sl	10 ⁵	10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	NT
13	265	kontrola	—	—	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	NT	10 ⁴

Pl — plíce
Sl — slezina

Td — thyreoidea
Tm — thymus

Le — ledvina
Va — varlata

⁺ TKID₅₀/0,1 ml

II. Multiplikace viru IBR, PI-3 a BVD-MD ve fetálních buněčných kulturách latentně infikovaných virem PI-3 — The multiplication of the IBR, PI-3 and BVD-MD viruses in foetal cell cultures latently infected with the PI-3 virus

Fetus č.	Stáří dní	Dny p. i. <i>in utero</i>	Titř viru (TKID ₅₀) v buněčné kultuře								
			Le			SI			PI		
			IBR	PI-3	BVD	IBR	PI-3	BVD	IBR	PI-3	BVD
5	113	7	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	NT	10 ⁴	10 ⁵	10 ²
7	173	7	10 ⁵	10 ⁶	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ³	10 ⁵	10 ⁵	NT

III. Tvorba hemaglutininu PI-3 ve fetálních buněčných kulturách latentně infikovaných virem PI-3 a inokulovaných *in vitro* virem IBR a BVD-MD — The production of PI-3 haemagglutinin in foetal cell cultures latently infected with the PI-3 virus and inoculated *in vitro* with IBR and BVD-MD viruses

Fetus č.	Druh buněčné kultury	Titř hemaglutininu za dní po infekci virem					
		3		4		5	
		IBR	BVD	IBR	BVD	IBR	BVD
5	ledvina	128	neg.	8	neg.	neg.	neg.
	slezina	64	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	plice	64	neg.	4	neg.	neg.	neg.
7	ledvina	128	128	8	16	neg.	neg.
	slezina	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	plice	8	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	varlata	8	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

IV. Tvorba hemaglutininu PI-3 ve fetálních buněčných kulturách latentně infikovaných virem PI-3 a inokulovaných *in vitro* virem PI-3 — The production of PI-3 haemagglutinin in foetal cell cultures latently infected with the PI-3 virus and inoculated *in vitro* with the PI-3 virus

Druh buněčné kultury	Titř hemaglutininu za dní po infekci		
	3	4	5
Ledvina	1024	128	32
Slezina	32	32	32
Plice	32	8	8
Varlata	1024	128	32

Rostoucí orgánové kultury připravené z tkání čtyřměsíčních až devítiměsíčních neinfikovaných fétů byly vnímavé k infekci virem PI-3, který se v nich množil po celou dobu desetidenní kultivace. Dynamika růstu viru a jeho intenzita byla závislá na druhu tkáně a stáří fétů, přičemž orgánové kultury pětiměsíčního fétu produkovaly větší množství viru než kultury z fétů devítiměsíčních (tab. Va, VIa).

V. Množení viru v orgánových kulturách z fétů kontrolních, pět měsíců starých: a) PI-3, b) IBR — The multiplication of viruses in organ cultures from five-month-old control fetuses: a) PI-3, b) IBR

Dny p. i.		TKID ₅₀ v orgánových kulturách						
		Tr	Td	Tm	Pl	Le	Sl	Va
a	2	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ^{3,5}	10 ^{2,5}	10 ^{4,5}	10 ⁶
	3	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ^{4,5}	10 ⁴	10 ^{4,5}
	5	10 ⁶	10 ⁶	10 ^{5,5}	10 ⁵	10 ^{4,5}	10 ⁵	10 ⁶
	7	10 ^{3,5}	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴
	10	10 ^{4,5}	10 ^{4,5}	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶
b	2	10 ³	10 ²	10 ³	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁵
	3	10 ⁵	10 ^{4,5}	10 ⁵	10 ^{5,5}	10 ^{5,5}	10 ⁵	10 ^{5,5}
	5	10 ^{6,5}	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ^{5,5}	10 ⁵	10 ⁶
	7	10 ^{6,5}	10 ⁵	10 ^{4,5}	10 ⁶	10 ^{5,5}	10 ⁴	10 ^{5,5}
	10	10 ⁵	10 ⁴	10 ^{4,5}	10 ⁵	10 ⁵	10 ^{3,5}	10 ⁶

Také množství viru IBR produkovaného v orgánových kulturách pětíměsíčních fétů bylo o 1 až 2 logaritmy vyšší než v orgánových kulturách plodů devítiměsíčních (tab. Vb, VIIa).

Persistující infekce pětíměsíčního fétu virem PI-3 neovlivnila vnímavost orgánových kultur z jeho tkání k infekci virem IBR a PI-3 *in vitro*. Růstové křivky obou virů v orgánových kulturách se kvantitativně i kvalitativně podobaly růstovým křivkám získaným při infekci orgánových kultur z kontrolních neinfikovaných fétů. Výraznější signifikantní inhibice růstu u viru IBR byla prokázána v orgánových kulturách z devítiměsíčního fétu č. 1, infikovaného virem PI-3 a BVD-MD, i v orgánových kulturách z devítiměsíčního fétu č. 2, zpracovaného za 14 dní po infekci pouze virem BVD-MD. Virus IBR se ve tkáních obou plodů téměř nemnožil, množství volného viru v médiu se rychle snižovalo a na konci kultivace nebyl prokázán buď vůbec, nebo jen v nízkých titrech (tab. VIIa, b). Podobný pokles vnímavosti, především v kulturách trachey, thymu, thyreoidy a sleziny, byl zjištěn po infekci stejných kultur virem PI-3 (tab. VIa, b).

Virus IBR se však velmi dobře množil v orgánových kulturách při-

VI. Množení viru PI-3 v orgánových kulturách z devítiměsíčních fétů: a) fétus č. 13 kontrolní; b) fétus č. 2 infikovaný virem BVD (256 dní) — Multiplication of the PI-3 virus in the organ cultures from nine-month-old foetuses: a) control foetus no. 13; b) BVD-virus-infected foetus no. 2 (256 days)

Dny p. i.		TKID ₅₀ v médiu orgánových kultur					
		Tr	Td	Tm	Pl	Le	Sl
a	2	10 ³	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ¹
	3	10 ⁵	10 ¹	10 ^{3,5}	10 ⁵	10 ^{4,5}	10 ²
	5	10 ^{5,5}	10 ¹	10 ¹	10 ⁵	10 ⁵	10 ²
	7	10 ⁵	10 ¹	10 ⁶	10 ⁵	10 ¹	10 ³
	10	10 ¹	10 ^{2,5}	10 ³	10 ^{4,5}	10 ⁵	10 ¹
b	2	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ³	K	10 ¹
	3	10 ²	10 ³	10 ¹	10 ³	10 ¹	K
	5	10 ²	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ¹	neg.
	7	K	K	neg.	10 ¹	10 ³	10 ¹
	10	K	K	neg.	10 ¹	K	10 ³

pravených z fétů č. 7, a to i v přítomnosti viru PI-3 (tab. VIII). Virus PI-3 byl prokázán v kontrolních neinfikovaných orgánových kulturách plic, ledvin, sleziny, varlat a thymu v době od třetího do jedenáctého dne po založení kultury a od čtvrtého do desátého dne po infekci kultury

VII. Množení viru IBR v orgánových kulturách devítiměsíčních fétů: a) fétus č. 13 kontrolní; b) fétus č. 2 infikovaný virem BVD (256 dní) — Multiplication of the IBR virus in the organ cultures of nine-month-old foetuses: control foetus no. 13; b) BVD-infected foetus no. 2 (256 days)

Dny po založení		TKID ₅₀ v médiu orgánových kultur					
		Tr	Td	Tm	Pl	Le	Sl
a	2	10 ²	10 ^{3,5}	10 ²	10 ⁵	10 ²	10 ²
	3	10 ⁵	10 ^{3,5}	10 ⁵	10 ⁵	10 ¹	10 ¹
	5	10 ⁵	10 ^{4,5}	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ¹
	7	10 ^{4,5}	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
	10	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ^{4,5}
b	2	10 ³	NT	10 ²	10 ³	10 ³	10 ²
	3	K	NT	K	K	K	K
	5	K	NT	K	10 ²	10 ²	K
	7	0	NT	K	10 ²	10 ³	K
	10	0	NT	K	10 ²	10 ¹	0

VIII. Množení viru IBR v orgánových kulturách latentně infikovaných virem PI-3
 — The multiplication of the IBR virus in the organ cultures latently infected with the PI-3 virus

Dny po založení orgánové kultury	Dny p. i.	TKID ₅₀ virů v orgánových kulturách										
		PI			Le		SI		Va		Tm	
		IBR	PI-3	HA	IBR	PI-3	IBR	PI-3	IBR	PI-3	IBR	PI-3
3	2	10 ⁴	10 ⁴	neg.	10 ²	neg.	10 ¹	neg.	10 ²	neg.	10 ¹	10 ⁵
5	4	10 ³	10 ²	32	10 ⁶	neg.	K	neg.	10 ²	neg.	10 ⁶	neg.
7	6	10 ⁶	10 ⁶	32	10 ⁶	neg.	10 ⁵	neg.	10 ⁶	neg.	10 ⁵	10 ⁴
9	8	10 ⁶	NT	16	10 ⁶	neg.	10 ⁵	neg.	10 ⁶	neg.	10 ⁶	neg.
11	10	10 ⁵	10 ⁴	neg.	10 ⁵	neg.	10 ⁵	neg.	10 ⁵	neg.	10 ⁶	neg.

in vitro. Jeho titr v médiu orgánových kultur plic se pohyboval v rozmezí 10² až 10⁶ a v orgánových kulturách thymu byl zjištěn dva až šest dní po infekci v titrech 10⁵ a 10⁴ (tab. VIII). Je pozoruhodné, že i v přítomnosti viru PI-3 dosahoval virus IBR v orgánových kulturách plic a thymu vysokých titrů. V ostatních orgánových kulturách se do vysokých titrů množil ještě za deset dní po infekci, zatímco multiplikace viru PI-3 byla v orgánových kulturách ledvin, sleziny a varlat po infekci virem IBR potlačena.

DISKUSE

Význam rychle rostoucích fetálních buněčných kultur, nízko pasážovaných buněk a rostoucích fragmentů z různých orgánů a tkání hovězích fétů pro izolaci a kultivaci obtížně prokazatelných virů je nesporný. Tyto způsoby kultivace byly použity k izolaci bovinních parvovirů (Bates aj., 1972), bovinního respiračního syncytiálního viru

IX. Průkaz viru PI-3 v orgánových kulturách z fétu č. 7, připravených za sedm dní po intrauterinní infekci — Demonstration of the PI-3 virus in organ cultures from foetus no. 7 prepared seven days from intrauterine infection

Dny po založení orgánové kultury	+PI	++Le	SI	Va	Tm
8	10 ⁶	32	4	256	10 ⁵
5	10 ⁶	64	16	64	10 ⁴
7	10 ⁵	64	16	64	10 ⁴
9	10 ⁵	128	64	64	10 ³
11	10 ⁴	NT	neg.	NT	10 ²

+ TKID₅₀

++ HA titr v 1. pasáži na primárních fetálních ledvinových buňkách

(Smith aj., 1974), reo-like viru (Welch a Twiehaus, 1973), bovinního koronaviru (Mebus aj., 1973) a bovinních enterovirů (Dunne aj., 1974) z respiračního a enterálního traktu, z abortovaných fétů, neonatálních telat a z různých částí genitálního traktu skotu. Jejich širší využití v rutinní diagnostice je limitováno stále častěji zjišťovanou kontaminací fétů a jejich orgánů a tkání různými viry. Svědčí o tom informace o nálezech specifických protilátek a imunoglobulinů v krevním séru fétů a novorozených telat a detekce virů, které mají schopnost dlouhodobě persistovat v organismu telat a dospělého skotu a mohou být často zjišťovány i v tkáních fétů a telat bezprostředně po narození (Menšík aj., 1976; Pospíšil aj., 1979; Gratzek aj., 1966; Mc Kercher, 1968; York, 1968). Dlouhodobá persistence, která je příčinou trvalé cirkulace viru ve stádě skotu, byla opakovaně potvrzena u viru slizniční choroby (BVD-MD) (Mills a Luginbuhl, 1968; Lambert a Fernelius, 1968), u viru IBR (Mc Kercher aj., 1968; Snowdon, 1965; Böttcher a Mahler, 1970; Huck aj., 1973), i u bovinního parvoviru (Storz aj., 1978).

Persistující infekci fétů virem IBR popsali Pospíšil aj. (1979), když izolovali virus z jater, sleziny, ledvin, plicních mýzních uzlin a střev novorozených bezkolostrálních telat, o nichž se dalo předpokládat, že po napití kolostra přežijí.

Dosažené výsledky, popsané v této práci, potvrzují, že viry PI-3, BVD-MD i parvovirus skotu mohou po proniknutí do fétu i dlouhodobě persistovat v jeho orgánech a tkáních. Jsou sice obtížně prokazatelné klinickou technikou inokulace orgánových suspenzí na buněčné kultury (Menšík aj., 1981), ale mohou být detekovány v rostoucích orgánových kulturách připravených přímo z vyšetřovaných fétů (Machatková aj., 1981). Při použití buněčných nebo orgánových kultur z fétů intrauterinně infikovaných jsme zjistili, že některé viry se množí po inokulaci *in vitro* i v přítomnosti endogenního persistujícího viru, zatímco v jiných případech je multiplikace nakultivovaného viru potlačena. Tak např. viry BVD-MD a IBR se množily v primárních buněčných kulturách i v přítomnosti viru PI-3, který v nich mohl být vedle obou nakultivovaných virů identifikován.

Persistující infekce virem PI-3 neovlivnila ani vnímavost rostoucích orgánových kultur k viru IBR. Oba viry se v některých orgánových kulturách množily do vysokých titrů, zatímco v jiných byla multiplikace endogenního viru PI-3 potlačena.

Výrazná inhibice růstu byla však zaznamenána u viru IBR v orgánových kulturách z fétů infikovaných virem BVD-MD.

Z našich výsledků, které korelují s nálezy jiných autorů, je zřejmé, že používání buněčných a orgánových kultur z fétů pocházejících z chovů s neznámou nebo složitou epizootologickou situací může být ve virologické diagnostice komplikováno přítomností endogenního viru. Ten může být identifikován někdy až po inokulaci kultury vyšetřovaným materiálem a v tom případě mohou být v jedné buněčné nebo orgánové kultuře prokazovány po určitou dobu současně dva viry. Endogenní virus může být zpravidla zjištěn jen technikou dlouhodobě kultivovaných kontrolních orgánových kultur.

Literatura

- BATES, R. C. — STORZ, J. — REED, D. E.: Isolation and comparison of bovine parvoviruses. *J. infect. Dis.*, 126, 1972, s. 531-536.
- BÖTTCHER, R. — MAHLER, R.: Investigations on the persistence of the bovine IBR-IPV virus in the semen of naturally infected bulls. *Dte tierärztl. Wschr.*, 77, 1970, s. 421-429.
- ČEPICA, A. — POSPÍŠIL, Z. — MENŠÍK, J. — KREJČÍ, J. — KRUPÍČKA, V. — KRPATA, V.: Význam viru BVD a IBR při vzniku enzootických abortů a perinatálních ztrát telat. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1977. 31 s.
- DUNNE, H. W. — HUANG, C. M. — LIN, W. J.: Bovine enteroviruses in the calf: an attempt at serological, biologic, and pathologic classification. *J. Am. vet. med. Ass.*, 164, 1974, s. 290-294.
- FRANZ, J. — KREJČÍ, J. — MENŠÍK, J.: Serum antibodies and immunoglobulins of newborn calves. *Zentbl. VetMed.*, B, 21, 1974, s. 540-549.
- GAVRILOV, V. I.: Citoproliferativnaja aktivnost virusov. *Vop. Virus.*, 17, 1972, s. 3-11.
- GRATZEK, J. B. — JENKINS, R. A. — PETER, C. P. — RAMSAY, F. K.: Isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus associated with enteritis in cattle: Comparative developmental study by fluorescent antibody tracing and electron microscopy. *Am. J. vet. Res.*, 27, 1966, s. 1573-1582.
- HORYNA, B. — LÁVIČKA, M. — KABELÍK, V. — KRPATA, V.: Průkaz hladin imunoglobulinů u abortovaných fétů skotu ve vztahu k výsledkům histologického, mikrobiologického a virologickosérologického vyšetření. *Vet. Med.*, Praha, 25, 1980, s. 545-555.
- HUBBERT, W. T. — BRYNER, J. H. — FERNELIUS, A. L. aj.: Viral infection of the bovine fetus and its environment. *Arch. Virusforsch.*, 41, 1973, s. 86-98.
- HUCK, R. A. — MILLAR, P. G. — WOODS, D. G.: Experimental infection of maiden heifers by the vagina with infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus. *J. comp. Path.*, 83, 1973, s. 271-279.
- JANKEVIČ, O. D. — DREJZIN, R. S.: Chroničeskaja infekcija kletok HeLa respiratorno-sincitalnym virusom. *Vop. Virus.*, 2, 1977, s. 142-147.
- LAMBERT, G. — FERNELIUS, A. L.: Bovine viral diarrhoea virus and *Escherichia coli* in neonatal calf enteritis. *Can. J. comp. Med.*, 32, 1968, s. 440-446.
- MACHATKOVÁ, M. — MENŠÍK, J. — ROZKOŠNÝ, V.: Růst fetálních bovinních buněk po intrauterinní virové infekci plodů. *Vet. Med.*, Praha, 26, 1981, s. 525-532.
- Mc KERCHER, D. G. — SAITO, J. K. — CRENSHAW, G. L. — BUSHNELL, R. B.: Complications in cattle following vaccination with a combined bovine viral diarrhoea-infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *J. Am. vet. med. Ass.*, 152, 1968, s. 1621-1624.
- Mc KERCHER, D. G.: Bovine respiratory infections. *J. Am. vet. med. Ass.*, 152, 1968, s. 729-733.
- MEBUS, C. A. — STAIR, E. L. — RHODES, M. B. — TWIEHAUS, M. J.: Neonatal calf diarrhoea: Propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. *Am. J. vet. Res.*, 34, 1973, s. 145-150.
- MENŠÍK, J. — POSPÍŠIL, Z. — SUCHÁNKOVÁ, M. aj.: Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis after experimental infection with parainfluenza 3 virus in young calves. *Zentbl. VetMed.*, B, 23, 1976, s. 854-864.
- MENŠÍK, J. — POSPÍŠIL, Z. — ROZKOŠNÝ, V. — MACHATKOVÁ, M. — MACHATY, J. — VLČEK, Z.: Detekce virů PI-3, BVD-MD a parvoviru, persistujících v bovinních fétách po experimentální intrauterinní infekci. *Vet. Med.*, Praha, 26, 1981, s. 701-707.
- MICHAJLOVA, G. R. — MONASTYREVA, L. A. — ČEREDNIČENKO, J. M. aj.: Srovnatelné issledovanie dvuch perevivajemych liniy myšinyh kletok L. *Vop. Virus.*, 2, 1977, s. 1232-1236.
- MILLS, J. H. L. — LUGINBUHL, R. E.: Distribution and persistence of mucosal disease virus in experimentally-exposed calves. *Am. J. vet. Res.*, 29, 1968, s. 1367-1376.
- NUTTALL, P. A. — LUTHER, P. D. — STOTT, E. N.: Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures. *Nature*, 266, 1979, s. 835-837.
- POSPÍŠIL, Z. — MENŠÍK, J. — ŠIMON, V. aj.: Patogeneze a imunologie respirač-

ních infekcí telat. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1979a. 40 s.

POSPÍŠIL, Z. — MENŠÍK, J. — KREJČÍ, J.: Demonstration of infectious bovine rhinotracheitis virus in newborn colostrum-deprived calves with particular reference to its epizootiological significance. Zentbl. VetMed., B, 26, 1979b, s. 325-335.

ROSSI, C. R. — BRIDGMAN, C. R. — KIESEL, G. K.: Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. Am. J. vet. Res., 41, 1980, s. 1680-1681.

SMITH, M. H. — FREY, M. L. — DIERKS, R. E.: Isolation and characterization of a bovine respiratory syncytial virus. Vet. Rec., 16, 1974, s. 599.

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

STORZ, J. — YOUNG, S. — CARROLL, E. J. aj.: Parvovirus infection of the bovine fetus: Distribution of infection, antibody response, and age-related susceptibility. Am. J. vet. Res., 39, 1978, s. 1099-1102.

WELCH, A. B. — TWIEHAUS, M. J.: Cell culture studies of a neonatal calf diarrhea virus. Can. J. comp. Med., 37, 1973, s. 287-294.

YORK, C. J.: Infectious bovine rhinotracheitis. J. Am. vet. med. Ass., 152, 1968, s. 758-762.

Došlo dne 4. 9. 1981

МЕНШИК, Я. — ПОСПИШИЛ, З. — — РОЗКОШНЫ, В. — МАХАТКОВА, М. — МАХАТЫ, Й. — ВЛЧЕК, З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно; Институт ветеринарии, Брно): Мультипликация вирусов IBR, PI-3 и BVD-MD в клетках органов и культур, приготовленных из говяжьих фетов после экспериментального внутриматочного заражения. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 709-719.

Внутриматочное заражение 4—9-месячных говяжьих фетов вирусом PI-3, BVD-MD и парвовирусом крупного рогатого скота за 7—72 дней до их приготовления не влияет заметно на восприимчивость первичных клеточных культур, приготовленных из органов и тканей, к дальнейшему вирусному заражению *in vitro*. Вирус BVD-MD и вирус IBR размножались в первичных клеточных культурах из органов фета, зараженного вирусом PI-3 за 7 дней до приготовления, причем и в присутствии эндогенного вируса PI-3. Продолжающееся заражение вирусом PI-3 не повлияло на восприимчивость фетальных культур к вирусам IBR и PI-3 *in vitro*. Вирус IBR и эндогенный вирус PI-3 размножались в культурах зобной железы и легких вплоть до высоких титров одновременно, тогда как в культурах из органов почек, селезенки и семенников размножение эндогенного вируса PI-3 тормозилось.

клеточные культуры; культуры из органов; персистентные инфекции; комбинированные инфекции

MENŠÍK, J. — POSPÍŠIL, Z. — ROZKOŠNÝ, V. — MACHATKOVÁ, M. — MACHATÝ, J. — VLČEK, Z. (Veterinary Research Institute, Brno; University of Veterinary Medicine, Brno): *Multiplication of the IBR, PI-3 and BVD-MD Viruses in Cell and Organ Cultures Prepared from Bovine Foetuses after Experimental Intrauterine Infection*. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 709-719.

The intrauterine infection of four- to nine-month-old bovine foetuses with the PI-3, BVD-MD and IBR viruses, performed 7 to 72 days prior to their delivery, did not exert any significant influence upon the susceptibility of primary cell cultures from foetal organs and tissues to further viral infection *in vitro*. The BVD-MD and IBR viruses multiplied in the primary cell cultures from the organs of a foetus infected with the PI-3 virus seven days before delivery even in the presence of endogenous PI-3 virus. Persisting infection with the PI-3 virus also failed to influence the susceptibility of foetal organ cultures to infection with the IBR and PI-3 viruses *in vitro*. The IBR virus and endogenous PI-3 virus multiplied simultaneously to high titres in the organ cultures of thymus and lungs whereas in the organ cultures of kidneys, spleen and testes the multiplication of endogenous PI-3 virus was suppressed.

cell cultures; organ cultures; persistent infection; combined infections

MENŠÍK, J. — POSPÍŠIL, Z. — ROZKOŠNÝ, V. — MACHATKOVÁ, M. — MACHATÝ, J. — VLČEK, Z. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno; Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): *Multiplikation der Viren IBR, PI- und BVD-MD in Zellen- und Organkulturen, die aus Rindfeten nach der experimentellen intrauterinen Infektion vorbereitet wurden*. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 709-719.

Die intrauterine Infektion von vier- bis neunmonatigen Rindfeten durch die Viren PI-3, BVD-MD und durch das Parvovirus von Rindvieh, die 7 bis 72 Tagen nach ihrem Herausnehmen verwirklicht wurde, beeinflusste nicht deutlich die Empfänglichkeit primärer Zellkulturen, die aus ihren Organen und Geweben zu einer weiteren Vireninfektion *in vitro* vorbereitet wurden. Die Viren BVD-MD und IBR vermehrten sich in den primären Zellkulturen aus Organen des durch das Virus PI-3 sieben Tage vor dem Herausnehmen infizierten Fetus (auch in der Anwesenheit des endogenen Virus PI-3). Die persistierende Infektion durch das Virus PI-3 beeinflusste nicht die Empfänglichkeit fetaler Organkulturen zur Infektion durch die Viren IBR und PI-3 *in vitro*. Das Virus IBR und das endogene Virus PI-3 vermehrten sich in Organkulturen von Thymus und Lungen in hohe Titer gleichzeitig, während in Organkulturen von Nieren, Milz und Hoden die Multiplikation des endogenen Virus PI-3 unterdrückt wurde.

Zellkulturen; Organkulturen; persistierende Infektion; kombinierte Infektion

Adresa autorů:

Doc. MVDr. Jaromír Menšík, CSc., MVDr. Zdeněk Pospíšil, CSc., MVDr. V. Rozkošný, ing. Marie Machatková, MVDr. Josef Machatý, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
MVDr. Zdeněk Vlček, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

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.

DALSGAARD, K.

D 34.761/69

A study of the isolation and characterization of the Saponin Quil A. Evaluation of its adjuvant activity, with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease.
Copenhagen, Kandrup & Wunsch 1978. 40 s., 1 obr. Acta veterinaria Scandinavica, supplementum 69. (Slintavka a kulhavka — vakcíny — účinnost — adjuvans — Saponin Quil A — vliv — skot — výzkum — Dánsko)

TODD, A. — BEHLOW, R. — BATTE, E.

C 21.944/89

International parasites of swine: Natural history and control

Lexington (Kentucky), Univ. 1979. Nestr. ASC 89. (Cizopasníci vnitřní — prase)

ERBER, M. — GEISEL, O.

C 25.630/23

Untersuchungen zur Klinik und Pathologie der Sarcocystic-suicanis-Infektion beim Schwein

Berlin, Verlag Paul Parey 1980. S. 198-202, obr. (*Sarcocystic suicanis* — cizopasník — prase — výzkum — metody — NSR)

KONTRIMAVIČUS, V. L. — DELJAMURE, S. L.

C 8.186/29

Filjaroidiny domašnich i dikich životnych

Moskva, Nauka 1979. 153 s., 83 obr., 6 tab. Osnovy nematodologii 29. (Domáci zvířata a zvířata divoká — cizopasníci — plicnivkovití — výzkum — SSSR)

War on warbles

C 23.512/67/1978

Toronto (Ontario), Min. of agric. and food 1978. Nestr., obr., tab. Factsheet 67/1978. (Střeček hovězí — cizopasník — skot — hubení)

DIAGNOSTIKA EXPERIMENTÁLNÍ CYSTICERKÓZY SKOTU ELISA TESTEM

E. Chroustová

CHROUSTOVÁ, E. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Diagnostika experimentální cysticerkózy skotu ELISA testem*. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 721-730.

U sedmi telat plemene české strakaté a černostrakaté nížinné, která byla ve věku dva až tři a půl měsíce experimentálně invadována perorální dávkou 5000, 10 000, 25 000, 70 000, 95 000, 113 000 a 120 000 vajíček *Taenia saginata*, byly ELISA testem prokázány protilátky u telete s dávkou 70 000 vajíček již za týden po invazi, u ostatních telat za dva až tři týdny po invazi. Vzestup protilátek v krevním séru invadovaných zvířat byl statisticky významný od čtvrtého do desátého týdne po invazi, kdy bylo dosaženo titru 1 : 160 až 1 : 320 a kdy se naměřené extinkční hodnoty pohybovaly od 0,53 do 0,58. Hladina protilátek se udržovala na průkazně pozitivní hranici sedm a půl až devět měsíců. Klinické příznaky jsme pozorovali u telat, která obdržela invazní dávku 25 000 až 120 000 vajíček od 10. až 11., resp. 19. dne po invazi po dobu 7 až 20 dnů. U ostatních telat nebyly klinické příznaky průkazné. Při postmortálním vyšetření čtyř telat jsme našli 2,1 až 3,9 % cysticerků z aplikovaných vajíček. Enzymaticko-immunologická metoda ELISA, která byla při cysticerkóze v ČR použita poprvé, je vhodná k detekci protilátek proti parazitu *Cysticercus bovis* v krevním séru telat experimentálně invadovaných vajíčky tasemnice *Taenia saginata*.

Cysticercus bovis; telata; dynamika protilátek; *Taenia saginata*

Prevence parazitóz ve velkochovech hospodářských zvířat je nezbytnou součástí jejich účinného tlumení. Odhalování zdrojů invazí a včasná diagnostika má význam zejména v současné době, kdy kooperující podniky přemísťují zvířata ze vzdálených míst na pastviny, přičemž se po jejich návratu mohou různá onemocnění objevit i tam, kde se dříve nevyskytovala. To platí i u cysticerkózy, která se v letech 1971 až 1978 vyskytovala na území ČR průměrně u 1,46 až 2,09 % poraženého skotu (Zajíček, 1980). Většinou se jedná o invaze pocházející ze zdrojů, které komunikují s technologií krmení skotu. Masivní výskyt cysticerkózy u 60 až 100 % zvířat z jedné stáje popisují Mour (1971), Musil a Musilová-Knišová (1974), Prokopič a Šterba (1978). Není snadné vyjádřit nálezy tasemnic *Taenia saginata* u člověka procentuálně, poněvadž v mnoha případech nečiní pacientům zdravotní potíže. V českých zemích bylo v letech 1976 až 1978 hlášeno v průměru 1000 případů ročně (Červová, 1979). Na rozdíl od ostatních parazitóz je možné cysticerkózu diagnostikovat teprve po dlouhé době chovu, popř. výkrmu u odporaženého zvířete. V průběhu let byly s rozdílnými výsledky ověřeny různé intravitální diagnostické metody jako

haemaglutinace, reakce vazby komplementu, imunofluorescence, precipitace v agaru, kožní test aj. V současné době se nabízí možnost využití jednoduchého, citlivého a snadno proveditelného sérologického enzymatického testu ke včasné diagnostice cysticercózy skotu.

Souhrnný přehled o možnostech využití ELISA testu v parazitologii podávají Voller aj. [1976]. O použití ELISA testu při diagnostice fasciolózy referují Grelck a Hörchner [1977], Hillyer a Weil [1979] a Rajasekariath a Howell [1980]. O zavedení ELISA testu pro diagnostiku cysticercózy u skotu referují Abdussalam aj. [1976], Geerts aj. [1977], Ruitenberg [1977] a Albert [1979]. Uvádějí, že ELISA test by mohl mít význam pro séroepidemiologický přehled o invazi parazita *Cysticercus bovis* v chovech.

Cílem této práce bylo sledovat ELISA testem změny obsahu protilátek v krevním séru telat po experimentální invazi odstupňovanými dávkami vajíček tasemnice *Taenia saginata*.

MATERIÁL A METODY

Použili jsme sedm klinicky zdravých telat, z toho tři plemene české strakaté a čtyři plemene černostrakaté nížinné, ve věku dva až tři a půl měsíce, o živé hmotnosti 70 až 97 kg. Zvířata byla krmena senem, krmnou směsí pro telata v dávce 0,30 kg na kus a den a napájena pitnou vodou *ad libitum*. K invazi byla použita vajíčka *Taenia saginata* (*T. saginata*) ze zralých proglotidů tasemnic vypuzených při terapii lidí. Vajíčka jsme získali mechanickým rozrušením deseti terminálních článků; po uvolnění byla opakovaně promývána ve fyziologickém roztoku. V odměřeném objemu kultury byl mikroskopicky stanoven jejich počet v 1 ml spočítáním 10 kapek po 0,1 ml. Než se invaze uskutečnila, byla kultura uchovávána v chladničce při teplotě +4 °C.

Jednotlivá telata obdržela jednorázově *per os* sondou do dutiny ústní 120 000 (tele č. 7), 113 000 (tele č. 4), 95 000 (tele č. 1), 70 000 (tele č. 5), 25 000 (tele č. 6), 10 000 (tele č. 8) a 5000 (tele č. 9) vajíček *T. saginata*. Invazní dávku od 95 000 výše posuzujeme jako silnou, invazní dávky 25 000 a 70 000 jako středně silné a invazní dávky 10 000 a 5000 vajíček jako slabé. Před zahájením pokusu byla telata během týdne denně koproskopicky vyšetřována, aby se zjistilo vyloučení případných invazí motolicemi, enterohelminty a kokcidie. Zároveň jsme sledovali denně týden před invazí a tři až čtyři týdny po invadování rektální tělesnou teplotu a klinicky jsme vyšetřovali celkový zdravotní stav zvířat. Krev byla odebírána z *vena jugularis* v den invaze před invadováním, tj. negativní vzorek, a pak v sedmidenních až čtrnáctidenních intervalech po invazi (*p. i.*) až do ukončení pokusu.

Telata č. 1, 4 a 5 byla odporazena za čtyři a půl, pět a půl a devět měsíců po invazi, tele č. 8 uhynulo za osm týdnů *p. i.* v důsledku onemocnění trávicích orgánů nejasné etiologie a zvířata č. 6, 7 a 9 zůstala ve sledování.

Protilátky v séru jsme zjišťovali imunodiagnostickou mikrometodou ELISA s tímto přístrojovým vybavením: mikrotitrační plotny s rovným dnem M-24 A, permanentní automatická pipeta o obsahu 100 μ l, konstriční pipety o obsahu 10—1000 μ l, digitální pH Meter OP 210, ultrazvukový homogenizátor ARTEX model 300, chlazená ultracentrifuga K 24, spektrofotometr Titertek^R Multiskan 310 C. Z reagensů byl k ředění antigenu používán uhličitanový pufr (pH 9,6), k ředění konjugátu a sér fosfátový pufr (pH 7,8). Dále jsme použili králíčí anti-hovězí IgG peroxidázový konjugát konzervovaný glycerinem (výrobce Human serum and vaccine institute, Budapest; 2 ml konjugátu byly připraveny ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství dr. Rodákem), nativní koňské sérum získané od zdravých zvířat a uchovávané při teplotě -60 až -70 °C a reagenty ke stanovení celkové bílkoviny antigenu. K vizualizaci reakce byla používána jako substrát 5-amino-salicylová kyselina (5 AS) a k ustálení reakce bylo používáno 1 mol/l NaOH.

Somatický antigen byl připraven z proglotidů *T. saginata*, získaných po medikamentózní léčbě lidí Yomesanem (fa Bayer). Hluboce zmražené proglotidy (teplo-

ta -60 až -70°C) jsme rozřezali na kousky, opětovně zmrazili tekutým dusíkem (cca 2 minuty) a homogenizovali mixérem (cca 1 minutu). Homogenát byl odvážen a smíchán s fyziologickým roztokem tak, aby na 1 g připadlo 2,5 ml fyziologického roztoku. Získanou emulzi jsme ošetřili ultrazvukem při 200 W po dobu dvakrát 1 minutu. Dále byla provedena centrifugace při 150 otáčkách za sekundu po dobu 10 minut při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$. Supernatant jsme rozdělili do ampulí po 1 ml, lyofilizovali ve vakuu a uložili v chladničce při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$. Kolorimetricky Lowryho metodou (Keil aj., 1959) byl v lyofilizovaném antigenu stanoven celkový obsah bílkovin a na základě získané hodnoty bylo titrací na mikrotitračních plotnách zjištěno jeho nejvýhodnější ředění.

Antigen ve zvolené koncentraci byl napipetován do jednotlivých jamek plotny v množství 100 μl a plotna byla inkubována 24 hodiny při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$, třikrát promyta fosfátovým pufrém v intervalu 1 minuty, vysušena, přikryta aluminiovou fólií a uložena v chladničce při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$.

U každé šárže konjugátu bylo rovněž na mikrotitračních plotnách zjišťováno jeho pracovní ředění jednak pomocí čistého bovinního IgG 2 použitého v koncentraci 0,1 μg celkové bílkoviny (c. b.) na ml, jednak pomocí hovězího séra pozitivního na parazita *Cysticercus bovis* (C. bovis).

Substrát v množství 80 mg byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody o teplotě 70°C a po vychlazení na pokojovou teplotu bylo upraveno potenciometricky pH na 6 ($\pm 0,1$) pomocí 1 mol/l NaOH. Těsně před použitím byl substrát smíchán s 0,05% H_2O_2 (9 dílů 5 AS a 1 díl H_2O_2).

Vyšetřovaná séra jsme ředili v poměru 1:10 až 1:1280 fosfátovým pufrém; abychom odstranili nespecifické reakce, přidávali jsme k nim 1% nativní koňské sérum.

VLASTNÍ PROVEDENÍ ELISA TESTU

Do každé jamky antigenem povlečených ploten jsme napipetovali zkoušené sérum v odpovídajícím stupni ředění v množství 100 μl . Plotna byla inkubována v termostatu 1 hodinu při teplotě 37°C , třikrát promyta fosfátovým pufrém po dobu 1 minuty a vysušena. Potom jsme napipetovali 100 μl konjugátu. Následovala další dvouhodinová inkubace při teplotě 37°C , trojí promytí fosfátovým pufrém a vytřepání. Konečně jsme napipetovali 200 μl substrátu a inkubovali plotnu při pokojové teplotě 30 minut. K přerušení reakce bylo do každé jamky napipetováno 20 μl 1 mol/l NaOH.

Při každém testu jsme kontrolovali specifitu reakce, a to použitím pozitivního (referenčního) a negativního séra v odpovídajícím stupni ředění. Dvě jamky v konečném ředění negativního séra jsme ponechali pro kontrolu konjugátu, ve kterém nebylo sérum použito.

Testy jsme vyhodnocovali jak vizuálně (byla posuzována intenzita zabarvení jednotlivých jamek stupni 0 až 4 ve srovnání s pozitivní a negativní kontrolou), tak kvantitativně na digitálním spektrofotometru Titertek^R Multiskan fa Dynatech (byla hodnocena optická denzita při 405 nm).

Při vizuálním hodnocení jsme za prokazatelně pozitivní považovali sérum se zabarvením nejméně v pěti ředěních, tj. 1:10 až 1:160. Při kvantitativním hodnocení byl za statisticky významně pozitivní posuzován vzorek, u něhož naměřená hodnota v příslušném ředění nebyla nižší než hodnota negativního séra vynásobená koeficientem 1,5. Naměřené hodnoty nejvyšších titrů protilátek a extinkcí jsme vynesli do grafů.

Uhynulé tele (č. 8) a tři odporazená telata (č. 1, 4 a 5) jsme podrobně postmortálně vyšetřili, cysticerky jsme vypreparovali a spočítali. Zvláštní pozornost jsme věnovali nálezům cysticerek na řezech stanovených předpisy a prohlídce masa po porážce zvířat, tj. ve svalovině vnějších a vnitřních maseterů, na spodině jazyka, ve svalovině srdce a v bráničních plířích. Pak jsme spočítali všechny cysticerky nalezené pod kůží, v podkožní svalovině a po otevření dutiny těla i na serózách, omentu, v ledvinách, játrech, slezině, srdci, plicích, bránici, jícnu, jazyku, mozku a stejně tak v kosterní svalovině, která byla za tím účelem všechna rozřezána na plátky o síle 0,5 až 1 cm.

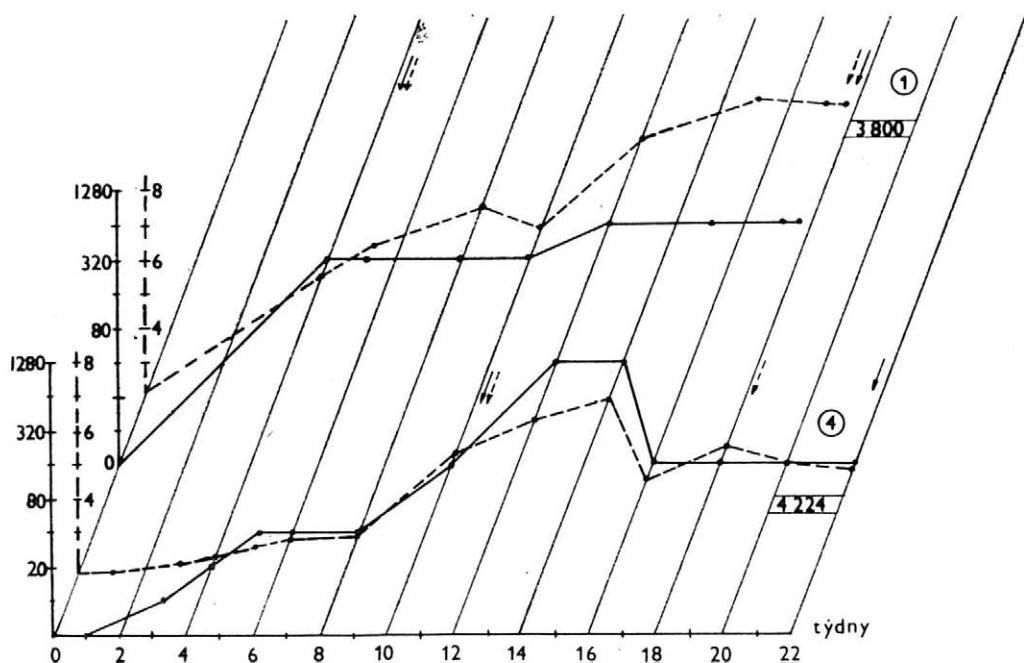
Z celkového počtu cysticerek jsme vypočítali procento jejich nálezů z podaných vajíček *T. saginata* a procentuálně jsme vyjádřili výskyt cysticerek na předilekčních místech a v jednotlivých orgánech, popř. svalových skupinách.

VÝSLEDKY

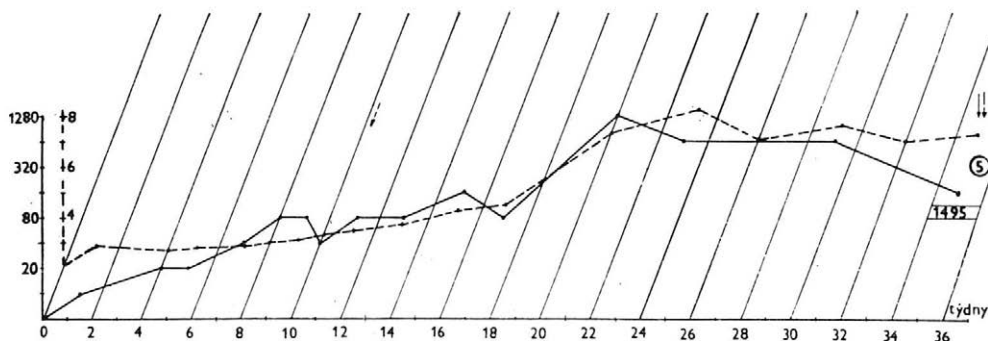
Telata zařazená do pokusu nejevila před invazí příznaky onemocnění, tělesná teplota se pohybovala od 38,6 do 39,4 °C. Koproovoskopickým vyšetřením nebyla zjištěna přítomnost cizopasníků. U telat č. 1, 4, 5 a 7, která obdržela silnou a středně silnou invazní dávku, se 10. až 11. den *p.i.*, u telete č. 6 pak 19. den *p.i.* zvýšila teplota na 39,7 až 40,2 °C, maximální hodnoty 40,8 °C dosáhla 12. až 16. den a k normálu poklesla za 17, v jednom případě za 30 dnů *p.i.* Klinicky byl zaznamenán kašel, zrychlené dýchání, hlenovitý až hlenohnisavý výtok z nosder, apatie, nechutenství, zježená srst a vyhublost. U telat č. 8 a 9, která obdržela 5000 a 10 000 vajíček, nepřesáhla teplota 39 °C a kromě hlenovitého výtoku z nosder nebyly pozorovány jiné příznaky onemocnění.

Vyrobený surový antigen obsahoval 9,2 mg proteinů v 1 ml. Titrací byla stanovena jako nejvhodnější koncentrace 25 µg na 1 ml. U použitých šarží konjugátu se nejlépe osvědčilo pracovní ředění 1 : 100.

První pozitivní výsledek byl zjištěn při vizuálním hodnocení již jeden týden po experimentální invazi u telete č. 5, které obdrželo středně silnou dávku (70 000 vajíček), druhý až třetí týden *p.i.* byly zjištěny protilátky u všech sledovaných telat (obr. 1—4). Vzestup titrů protilátek na pětinašobné ředění (1 : 160) byl u telat č. 1, 6, 7, 8 a 9 zaznamenán čtyři týdny *p.i.* bez ohledu na výši invazní dávky, ve dvou případech (telata č. 4 a 5) osmý a desátý týden. Ke druhému vzestupu titru protilátek (hodnoceno pouze šest telat), kdy byly zachyceny protilátky



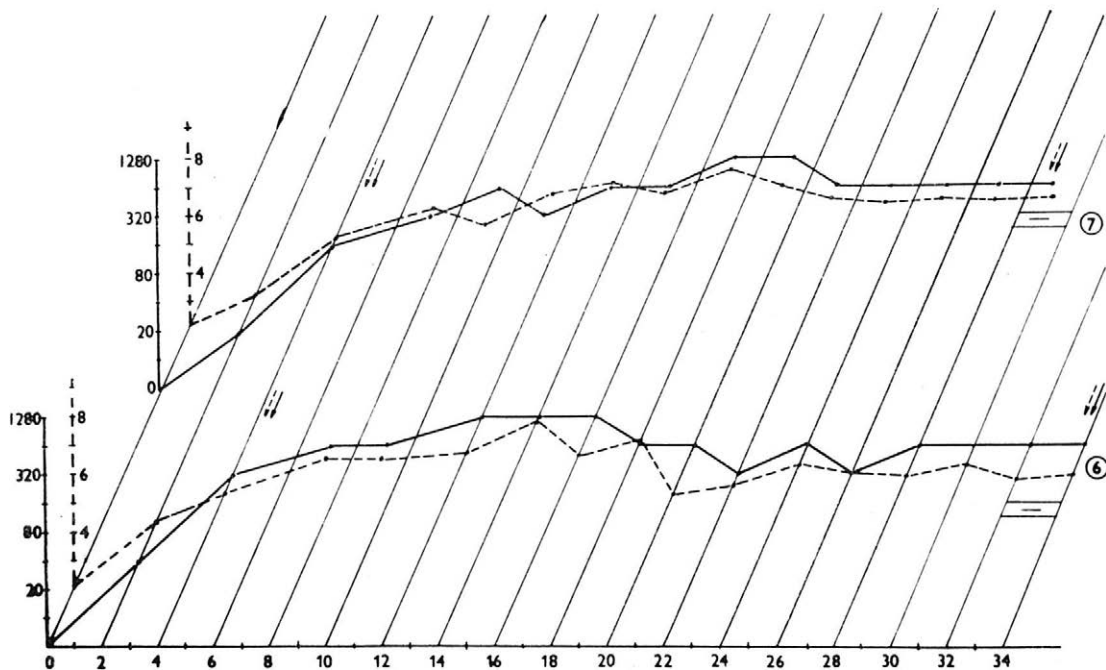
1. Extinkční hodnoty a nejvyšší titry protilátek v séru telat č. 1 a č. 4 experimentálně invadovaných vajíčky tasemnice *Taenia saginata* — Extinction values and the highest titres of antibodies in the serum of calves no. 1 and no. 4 experimentally invaded with the eggs of the tapeworm *Taenia saginata*



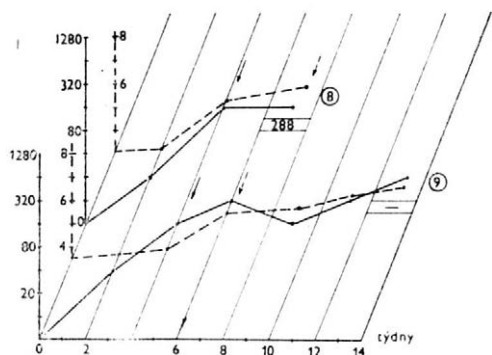
2. Extinkční hodnoty a nejvyšší titry protilátek v séru telete č. 5 experimentálně invadovaného vajíčky tasemnice *Taenia saginata* — Extinction values and the highest antibody titres in the serum of calf no. 5 experimentally invaded with the eggs of the tapeworm *Taenia saginata*

v séru v maximálním osminásobném ředění (1 : 1280), došlo u telat č. 1, 4 a 6 dvanáctý týden, u telat č. 5, 7 a 9 dvacátý, sedmnáctý a třináctý týden *p.i.*

Při měření na spektrofometru jsme zjistili statisticky významné hodnoty protilátek v séru zvířat (extinkční hodnoty 0,53 až 0,58) čtvrtý až desátý týden *p.i.* bez ohledu na výši invazní dávky. V období, kdy



3. Extinkční hodnoty a nejvyšší titry protilátek v séru telat č. 6 a č. 7 experimentálně invadovaných vajíčky tasemnice *Taenia saginata* — Extinction values and the highest antibody titres in the serum of calves no. 6 and no. 7 experimentally invaded with the eggs of the tapeworm *Taenia saginata*



4. Extinkční hodnoty a nejvyšší titry protilátek v séru telat č. 8 a č. 9 experimentálně invadovaných vajíčky tasemnice *Taenia saginata* — Extinction values and the highest antibody titres in the serum of calves no. 8 and no. 9 experimentally invaded with the eggs of the tapeworm *Taenia saginata*

jsme zaznamenali nejvyšší hraniční titry, bylo dosaženo rovněž maximálních extinkčních hodnot 0,69 až 1,7. Hladina protilátek se u tří dlouhodobě sledovaných telat (č. 5, 6 a 7) udržovala na průkazně pozitivní hranici 29, 34 a 35 týdnů *p.i.* Extinkční hodnoty negativních sér se v příslušném ředění pohybovaly v rozmezí 0,22 až 0,34; kontrola konjugátu byla rovněž negativní. Naproti tomu se u referenčního pozitivního séra pohybovaly nejvyšší extinkční hodnoty v rozmezí 0,627 až 1,217.

Při prohlídce svaloviny, seróz a orgánů bylo u telete č. 1 nalezeno celkem 3800 cysticereků, tj. 3,97 % z podaných vajíček, u telete č. 4 celkem 4224 cysticereků, tj. 3,77 %, u telete č. 5 celkem 1495 cysticereků, tj. 2,1 % a u telete č. 8 celkem 288 cysticereků, tj. 2,88 % z podaných vajíček. U telat, která obdržela 70 000 vajíček (tele č. 5) a 95 000 vajíček (tele č. 1), se cysticerky lokalizovaly v převážné míře v kosterní svalovině (81,5 a 83,0 %), v srdci bylo nalezeno 10,8 a 3,3 %, ve žvýkáci svalovině a na hlavě 5,1 a 6,6 %, v jazyku 1,4 a 3,5 % a v bráničních pilířích 0,2 a 2,2 % cysticereků. U telete č. 8 se slabou invazí 10 000 vajíček bylo naopak ve svalovině kosterní nalezeno pouze 38,2 % cysticereků, ostatní byly lokalizovány v srdci (21,2 %), ve žvýkáci svalovině a na hlavě (29,9 %), v jazyku (6,9 %), v bráničních pilířích (3,5 %). V parenchymatózních orgánech, a to převážně na jejich serózách, bylo nalezeno 0,3 až 1,3 % cysticereků. U telete č. 1 byly cysticerky lokalizovány i na místech atypických, jako jsou mozkové pleny, plicní a jaterní parenchym, brzlík a ocasní svalovina.

DISKUSE

V našich pokusech byla telata invadována rozdílnými dávkami vajíček *T. saginata*. Dávky vyšší než 25 000 vajíček vyvolaly výrazné klinické příznaky, které bylo možno pozorovat od 10. do 19. dne *p.i.* a trvaly 7, nejdéle 20 dní, ale u telat, která obdržela 5000 a 10 000 vajíček, nebyly klinické příznaky průkazné. Protilátky byly ELISA testem zjišťovány od sedmého dne *p.i.*, jejich hladina se zvyšovala a byla zjišťována po celou dobu vyšetřování bez ohledu na odstupňovanou invazní dávku vajíček. To znamená, že klinické příznaky vzhledem k jejich krátkodobému výskytu a úzké závislosti na invazní dávce nemají z hlediska diagnostiky význam, zatímco serologie ELISA testem je průkazná i při aplikaci nižších invazních dávek.

Shodně s autory Gallie a Sewell (1974) jsme pozorovali rozdíly ve výši dosažených extinkčních hodnot a nejvyšších titrů protilátek u telat invadovaných rozdílnými invazními dávkami. U zvířat, která obdržela slabou invazní dávku 5000 a 10 000 vajíček, se naměřené hodnoty pohybovaly na hranici významnosti, zatímco u zvířat, která obdržela středně silné a silné invazní dávky, byly naměřené extinkční hodnoty 2,5 až 2,8krát vyšší než nejnižší statisticky významná extinkční hodnota příslušného telete. Tomu odpovídaly i nejvyšší titry protilátek zjištěné při vizuálním hodnocení; u silně a středně silně zamořených zvířat byly zjištěny vysoké pozitivní titry (1 : 1280), u slabě zamořených zvířat titry poněkud nižší (1 : 640).

Titry protilátek u experimentálně zamořených zvířat mohou být vyšší než u zvířat přirozeně zamořených, jak uvádí Ruitenberg (1977), což souvisí pravděpodobně se silou invaze. Dosud se nám však nepodařilo vyvolat experimentálně slabou invazi, odpovídající přirozeným invazím s nálezem jednoho až tří cysticerků na řezu v maseterech nebo v srdci, neboť i u telete, u kterého bylo nalezeno pouze 288 cysticerků, jejich počet na predilekčních místech byl 10 až 15krát vyšší. Těchto skutečností jsme si vědomi a ze získaných poznatků nečiníme zatím konečné závěry.

Z výsledků je možné shrnout, že protilátky proti *C. bovis* se i po slabých invazních dávkách (5000 vajíček *T. saginata*) vytvářejí v těle meziphostitele v krátké době po podání invazního materiálu a maximální hladiny, závislé na individuální reakci zvířat, dosahují třetí až pátý měsíc *p.i.* Důležité je zjištění, že hladina protilátek se i u středně silně zamořených telat udržovala na průkazné výši 1 : 160 až 1 : 640 po dobu devíti měsíců *p.i.*, přičemž pokusy v době uzavření publikace dále pokračují.

Zkoušená séra nebyla testována ihned po získání, nýbrž po určité době skladování. Podle vlastního pozorování je možné hluboce zmrazená séra [−60 až −70 °C] uchovávat v aktivním stavu asi 1,5 roku. Séra byla používána v poměrně vysokém ředění (výchozí ředění 1 : 10) ve srovnání s některými jinými autory (Albert a Hörchner, 1979), kteří používali jako výchozí ředění 1 : 2. Používali jsme hrubého antigenu z *T. saginata*. Jeho biologickou aktivitu jsme vyjadřovali stanovením proteinového obsahu běžně používanou Lowryho technikou, i když jsme si byli vědomi nepřesnosti této biochemické charakteristiky.

Při pitvě nebyly zjištěny významné procentuální rozdíly uchycení cysticerků z podaných vajíček *T. saginata* (2,1 až 3,9 %); pozoruhodná však byla nerovnoměrnost jejich rozmístění na predilekčních místech (srdce, žvýkáci svalovina, jazyk, brániční pilíře), v parenchymatózních orgánech a v kosterní svalovině. U zvířat s celkovým nálezem 1495 a 4224 cysticerků byla převážná část (81,5 — 83,0 %) lokalizována v kosterní svalovině předních a zadních končetin, ve svalovině krční, zádové, břišní, mezižeburní a hrudní. Na predilekčních místech bylo nalezeno pouze 17,0 až 18,5 % cysticerků. Walther a Koske (1980) dokonce uvádějí, že u 34 ze 60 zamořených telat cysticerky na predilekčních místech nenašli, tj. u 56,7 % zvířat nebyla běžnou prohlídkou cysticerkóza diagnostikována.

Telata jsou 100% vnímavým meziphostitelem tasemnice *T. saginata*. Nainvadovaná telata jsou vhodná k získávání referenčních, silně pozitivních sér, mohou sloužit ke studiu obranných reakcí organismu na in-

vazi *C. bovis*, k vyhodnocování terapeutických zákroků aj. ELISA test mohou laboratoře dělat bez zvláštního přístrojového vybavení, antigen z *T. saginata* je možno vyrobit v dostatečném množství a uchovávat v lyofilizovaném stavu při teplotě +4 °C několik let, králíčí anti-hovězí IgG peroxidázový konjugát, jehož příprava závisí na mnoha faktorech, bude vyrábět od roku 1982 ÚSOL Praha (Mančál a Malý, 1981).

Uvedené modelové pokusy sloužily k prověřování citlivosti moderní progresivní sérologické metody ELISA při cysticercóze skotu a k zachycení dynamiky invaze po podání známé invazní dávky vyšší než 5000 vajíček tasemnice *T. saginata*. Metoda ELISA byla v ČSR k diagnostice cysticercózy použita poprvé a bylo zjištěno, že při experimentálních invazích je vysoce citlivá.

Poděkování

Za spolupráci při získávání invazního materiálu děkuji MUDr. T. Mittermayerovi, CSc., primáři interního oddělení Fakultní nemocnice v Košicích, za přípravu konjugátu MVDr. L. Rodákovi, CSc., za technickou spolupráci s. I. Křížkové.

Literatura

- ABDUSSALAM, M. — GEMMELL, M. A. — GRIFFITHS, R. B. et al.: Research needs in taeniasis-cysticercosis (Memorandum). Bull. Hlth Org., 53, 1976, č. 1, s. 67-73.
- ALBERT, H.: Untersuchungen über Immunoreaktionen beim *Cysticercus bovis*-Befall des Rindes. [Inaugural — Dissertation.] Berlin 1979, 49 s. — Freien Universität Berlin. Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin.
- ALBERT, H. — HÖRCHNER, F.: Zur Bekämpfung und Diagnostik der Rinderfinnen. II. Serologische Untersuchungen mit dem ELISA. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 92, 1979, č. 10, s. 189-193.
- CERVOVÁ, H.: Hlášení střevních invazí na území ČSR. Zprávy čs. Společ. parasitol., 19, 1979, č. 3-4, s. 23-25.
- GALLIE, G. J. — SEWELL, M. M. H.: The serological response of three months old calves to infection with *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*) and their resistance to reinfection. Trop. Anim. Hlth Prod., 6, 1974, s. 163-171.
- GEERTS, S. — KUMAR, V. — VERCRUYSE, J.: *In vivo* diagnosis of bovine cysticercosis. Vet. Bull., 47, 1977, s. 653-664.
- GRELCK, H. — HÖRCHNER, F.: Vergleichende Untersuchungen zur Serodiagnostik der Rinderfasziolose mit dem indirekten Immunofluoreszenz- und Immunoperoxidasetest (ELISA). Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 90, 1977, č. 17, s. 332-335.
- HILLYER, G. V. — WEIL, N. s. de: Use of immunologic techniques to detect chemotherapeutic success in infections with *Fasciola hepatica*. II. The enzyme linked immunosorbent assay in infected rats and rabbits. J. Parasit., 65, 1979, č. 5, s. 680-684.
- KASSAI, T. — BALLA, É. — REDL, P. — CSÉCSI NAGY, M.: The detection of bovine cysticercosis by the enzyme-linked immunosorbent assay. Summaries XXith World veter. Congr. Moskva, 2, 1979, s. 48-49.
- KEIL, B. — ŠORMOVÁ, Z. a kol.: Laboratorní technika biochemie. Praha, ČAV 1959, s. 490-491.
- MANČÁL, P. — MALÝ, J.: Současný stav a perspektivy výroby reagentů pro enzymatické metody v ÚSOL, o. p. Pracovní seminář o enzymatických imunoesejích. Praha 1981.
- MOUR, K.: Nález uhřivosti u skotu na jatkách v Poděbradech v letech 1961—1970. Veterinářství, 21, 1971, č. 12, s. 547-549.
- MUSIL, S. — MUSILOVÁ-KNIŠOVÁ, S.: Cysticercóza skotu v západočeské lázeň-

ské oblasti. Ref. na konf. I. Rašínovy dny, sekce toxoplasmózy, izosporózy a aktuálních antropozoonóz. VŠV Brno, 1974.

PROKOPIČ, J. — ŠTERBA, J.: Epidemiologie a epizootologie taeniázy a cysticerkózy *Taenia saginata* Goeze, 1782. [Výzkumná zpráva.] Praha, ČSAV 1978. 69 s.

RAJASEKARIAH, G. R. — HOWELL, M. J.: Enzyme assay for detecting resistance to reinfection with the liver fluke *Fasciola hepatica* in rats. Res. vet. Sci., 29, 1980, s. 124-125.

RUITENBERG, E. J.: Serological diagnosis of trichinosis in pigs and cysticercosis in cattle. Tijdschr. Diergeneesk., 102, 1977, č. 14, s. 826.

Směrnice FMZVŽ o veterinární péči při zabezpečování zdravotní nezávadnosti a biologické hodnoty potravin a surovin živočišného původu. Praha 1978.

VOLLER, A. — BIDWELL, D. E. — BARTLETT, A.: Present and potential uses of microplate enzyme immunoassays. R. S. first symposium on non-isotopic immunoassays, Chicago, 1976.

WALTHER, M. — KOSKE, J. K.: *Taenia saginata* cysticercosis: a comparison of routine meat inspection and carcass dissection result in calves. Vet. Rec., 106, 1980, č. 18/19/20, s. 401-402.

ZAJÍČEK, D.: Cysticerkóza skotu a taeniázy u lidí. (Zásady tlumení.) Praha, ÚSVÚ 1980. 18 s.

Došlo dne 4. 9. 1981

ХРОУСТОВА, Э. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Диагностика экспериментального цистицеркоза крупного рогатого скота с помощью ELISA-теста. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 721-730.

У 7 телят чешской пестрой и черно-пестрой низменной пород, которых в возрасте 2—3,6 месяцев экспериментально инвадировали через рот дозами 5000, 10 000, 25 000, 70 000, 95 000, 113 000 и 120 000 яйцами *Taenia saginata*, с помощью ELISA-теста были доказаны антитела у теленка с дозой 70 000 яиц уже спустя неделю после инвазии, а у остальных телят — спустя 2—3 недели после инвазии. Рост антител в сыворотке крови инвадированных животных был статистически значительным в период от 4-й до 10-й недель после инвадирования, когда был получен титр 1:160—1:320, а замеренные экстинкционные величины составляли от 0,53 до 0,58. Уровень антител сохранялся на достоверно положительной границе в пределах 7½—9 месяцев. Клинические признаки наблюдали у телят, получивших инвазийную дозу 25 000—120 000 яиц спустя 10—11 или 19 дней после инвадирования в течение 7—20 дней. У остальных телят клинические признаки не были достоверными. Послесмертное исследование 4 телят показало наличие 2,1—3,9 % цистицерков из употребленных яиц. Энзиматическо-иммунологический метод ELISA, впервые примененный для цистицеркоза в ЧСР, пригоден для детектирования антител против паразита *Cysticercus bovis* в кровяной сыворотке телят, экспериментально инвадированных яйцами солитера *Taenia saginata*.

Cysticercus bovis; телята; динамика антител; солитер *Taenia saginata*

CHROUSTOVÁ, E. (Veterinary Research Institute, Brno): *Diagnosis of Experimental Bovine Cysticercosis by the ELISA Method*. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 721-730.

Seven calves of the Bohemian Spotted and Black-Pied Lowland breeds, aged two to three months and a half, were experimentally invaded *per os* with 5 000, 10 000, 25 000, 70 000, 95 000, 113 000 and 120 000 eggs of *Taenia saginata*. In the calf invaded with 70 000 eggs, antibodies were detected by the ELISA method already a week from invasion and in the remaining calves two to three weeks from invasion. The increase in the content of antibodies in the blood serum of the invaded animals was statistically significant from the fourth to the tenth week from invasion when the titre was 1:160 to 1:320 and when the measured extinction values ranged from 0.53 to 0.58. The antibody level remained significant and positive for seven months and a half to nine months. Clinical symptoms were observed in the calves invaded with 25 000 to 120 000 eggs for a period of 7 to 20 days from the 10th to 11th or 19th day after invasion. In the remaining calves the clinical symptoms were not significant. The post-mortal examination of four calves showed 2.1 to 3.9 % of cysticerci from the applied eggs. The ELISA enzymatically immunological method,

which was used for the first time in the Czech Socialist Republic in the case of cysticercosis, is suitable for detecting antibodies to the parasite *Cysticercus bovis* in the blood serum of calves experimentally invaded with the eggs of the tapeworm *Taenia saginata*.

Cysticercus bovis; calves; dynamics of antibodies; *Taenia saginata*

CHROUSTOVÁ, E. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Diagnostik der experimentellen Zystizerkose von Rindvieh durch den ELISA-Test*. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 721-730.

Bei sieben Kälbern der Tschechischen Fleckviehrasse und der Schwarzbunten Niederungsviehrasse, die im Alter von zwei bis dreieinhalb Monaten experimentell durch die perorale Gabe von 5000, 10 000, 25 000, 70 000, 95 000, 113 000 und 120 000 Eiern *Taenia saginata* angesteckt wurden, wurden durch den ELISA-Test Gegenstoffe beim Kalb mit der Gabe von 70 000 Eiern bereits in einer Woche nach der Invasion, bei den anderen Kälbern in zwei bis drei Wochen nach der Invasion nachgewiesen. Der Aufstieg von Gegenstoffen im Blutserum der angesteckten Tiere war statistisch signifikant von der vierten bis zur zehnten Wochen nach der Invasion, da der Titer 1 : 160 bis 1 : 320 erreicht wurde und die gemessenen Extinktionswerte von 0,53 bis 0,58 schwankten. Der Spiegel von Gegenstoffen wurde signifikant auf der positiven Grenze von siebeneinhalb bis neun Monaten erhalten. Die klinischen Symptome wurden bei den Kälbern beobachtet, denen die Invasionsgabe von 25 000 bis 120 000 Eiern vom 10. bis 11., bzw. 19. Tag nach der Invasion im Laufe von 7 bis 20 Tagen verabreicht wurde. Bei den anderen Kälbern waren die klinischen Symptome unsignifikant. Bei einer postmortalen Untersuchung von vier Kälbern wurden 2,1 bis 3,9 % Zystizerken von den applizierten Eiern gefunden. Die enzymatisch-immunologische Methode ELISA, die bei der Zystizerkose in der CSR zum erstenmal angewendet wurde, ist geeignet zur Detektion von Gegenstoffen gegen den Parasiten *Cysticercus bovis* im Blutserum von Kälbern die durch die Eier des Bandwurmes *Taenia saginata* experimentell angesteckt wurden.

Cysticercus bovis; Kälber; Dynamik von Gegenstoffen; *Taenia saginata*

Adresa autorky:

MVDr. Eva Chroustová, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

UPLATNĚNÍ ALERGENODIAGNOSTIKY PŘI OZDRAVOVÁNÍ TUBERKULÓZOU NAKAŽENÉ DRŮBEŽE Z MALOCHOVŮ

M. Pavlas

PAVLAS, M. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Uplatnění alergenodiagnostiky při ozdravování tuberkulózou nakažené drůbeže z malochovů*. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 731-736.

Uplatnění intradermální tuberkulinace při ozdravování tuberkulózou nakažené drůbeže z malochovů pomocí eliminační metody závisí na stupni promoření drůbeže touto nákazou. Z dosažených výsledků vyplynulo, že eliminační metodu je možné doporučit pro praxi při incidenci reakcí na aviární tuberkulin do 5 až 10 %. Nezbytnou součástí eliminační metody je spolehlivá asanace prostředí po vyřazení nakažené drůbeže. Při výskytu reagentů na tuberkulin do 5 % se podařilo ozdravit dvě třetiny malochovů jednorázovým vyřazením pozitivních reagentů. V chovech s incidencí pozitivních reakcí od 5,1 do 10 % bylo ozdraveno eliminační metodou 84,7 % chovů, přičemž v některých případech bylo třeba tuberkulinaci opakovat třikrát, aby se dosáhlo beznákazového stavu. Při výskytu pozitivních reakcí nad 20 % se k ozdravení chovů drůbeže lépe osvědčila radikální metoda spočívající ve vyřazení drůbeže a v asanaci prostředí.

tuberkulóza drůbeže; ozdravování malochovů; tuberkulinace

Po eliminaci bovinní tuberkulózy u skotu v roce 1968 byla zaměřena pozornost na další zdroje patogenních mykobakterií, a to zejména u prasat a drůbeže. V srpnu 1968 byly schváleny metodiky ozdravovacích postupů týkající se eradikace tuberkulózy u drůbeže. Pomocí těchto opatření se podařilo cílevědomou prací veterinární služby, pracovníků zemědělských závodů a dalších organizací eliminovat do roku 1974 tuberkulózu drůbeže ve velkochovech. O úspěchu této akce svědčí výsledky veterinární prohlídky jatečné drůbeže pocházející převážně z velkochovů, u které se zjišťují nálezy tuberkulózy ve zcela ojedinělých případech. V roce 1978 byly prokázány u jatečné drůbeže pouze tři případy tuberkulózy, v roce 1979 celkem 160 nálezů, tj. 0,002 % z počtu poražených zvířat.

Hlavní podíl na ozdravení drůbeže ve velkochovech v uplynulém desetiletí měl zejména turnusový způsob obsazování asanovaných velkokapacitních objektů zdravou drůbeží a jednoletý cyklus chovu.

Naproti tomu tuberkulóza drůbeže v malochovech je i v současné době závažným zdrojem bakterií *Mycobacterium avium* pro ostatní druhy hospodářských i volně žijících zvířat. V těchto chovech je v posledních deseti letech nákazová situace přibližně na stejné úrovni. V některých okresech ČSR je možné zaznamenat v posledním období dokonce mírné zvýšení počtu pozitivních reagentů na aviární tuberkulin. V roce 1971

byla incidence těchto pozitivních reakcí 0,6 % z počtu 1 664 919 kusů vyšetřené drůbeže. V roce 1975 se zvýšilo procento pozitivních reakcí na aviární tuberkulin na 1,19 %. V roce 1980 bylo zjištěno při vyšetření drůbeže tuberkulinací 1,16 % pozitivních reakcí, tj. ve srovnání s rokem 1971 téměř dvojnásobný počet. Toto zvýšení počtu reagentů na tuberkulin u drůbeže však souviselo pravděpodobně v nemalé míře s převládajícím podílem drůbeže z malochovů.

Uvedené výsledky zdravotních zkoušek na tuberkulózu v malochovech svědčí o tom, že ozdravování drůbeže zůstává u soukromých chovatelů i nadále obtížným problémem. Úspěch ozdravovací akce závisí do značné míry na organizačním zajištění a přesvědčení chovatelů o zdravotním a hospodářském významu eliminace tuberkulózy u drůbeže. Kromě toho závisí výsledek ozdravovací akce v nemalé míře na eliminaci veškeré drůbeže nakažené tuberkulózou a na spolehlivé asanaci prostředí, ve kterém byla nemocná drůbež chována. Názory na spolehlivost alergenodiagnostiky, která se v současné době nejčastěji používá při diagnostice tuberkulózy u drůbeže i ostatních zvířat, jsou rozdílné, a to zejména při uplatnění této zkoušky pro ozdravování chovů drůbeže eliminační metodou.

Všeobecně se zastává názor, že ozdravení chovů drůbeže je obtížné a závisí na důsledném dodržování všech opatření nutných k eliminaci zdrojů nákazy, z nichž na prvním místě je nakažená drůbež a zamořené prostředí. Z vnějších zdrojů tuberkulózy se mohou uplatnit i volně žijící ptáci, kontaminované krmivo, stelivo a další faktory.

Tuberkulinace, která je nejužívanější metodou k diagnostice tuberkulózy, se používá u drůbeže zejména k vyhledávání chovů nakažených, tj. ohnisek nákazy. Spolehlivost tuberkulinace drůbeže je zejména v silněji zamořených chovech malá, a proto nelze této zkoušky použít v uvedených případech k eliminaci veškeré drůbeže nakažené tuberkulózou (Rozaňská, 1960; Vior, 1960; Pavlas, 1962; Karkadinovskaja, 1963; Švrček aj., 1965; Dvořák, 1968). Klimeš (1968) uvádí, že v chovech silně zamořených tuberkulózou nevedlo zpravidla ozdravování pomocí eliminace pozitivních reagentů na tuberkulin k cíli. V málo zamořených chovech doporučuje tento autor eliminaci všech pozitivních reagentů na tuberkulin, včetně drůbeže s klinickými příznaky tuberkulózy. Podle závažnosti doporučuje opakovat tuberkulinaci za jeden až tři měsíce.

Všeobecně se považuje eliminace pozitivních reagentů při intradermální tuberkulinaci drůbeže za velmi málo účinnou ozdravovací metodu. V některých státech se proto doporučovala při ozdravování radikální opakovaná výměna hejna, nejlépe po jednom snáškovém období. Tato metoda se však mnohdy setkává s nepochopením soukromých chovatelů. Kromě toho je při nízké incidenci aviární tuberkulózy v chovech s větším počtem drůbeže radikální výměna hejna v některých případech obtížně realizovatelná. Z uvedených důvodů jsme studovali uplatnění eliminační metody při různém stupni zamoření chovů tuberkulózou s cílem určit nejvhodnější způsob ozdravení drůbeže soukromých chovatelů.

MATERIÁL A METODA

Ve spolupráci s pracovníky veterinární služby jsme vyšetřili 422 malochovy drůbeže intradermální tuberkulinací PPD aviárním tuberkulinem v dávce 0,1 ml, tj. 2000 TU/dosis. Reakce jsme posuzovali za dva dny po inokulaci tuberkulinu. Zduření lalůčku jsme hodnotili kutimetrem. Reakci jsme vyjádřili indexem

$$I = \frac{R}{Z}$$

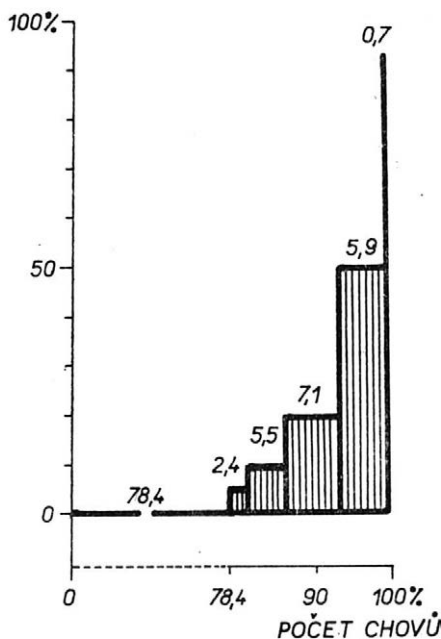
kde: Z — základní tloušťka lalůčku před inokulací tuberkulinu v mm
R — tloušťka lalůčku v mm zjištěná při posuzování reakce

Při $I > 2$ byla reakce posouzena jako pozitivní. Za dubiozní reakci byl považován index I 1,5–2 a za negativní I do 1,5. V chovech, ve kterých se u drůbeže vyskytly pozitivní nebo dubiozní reakce, jsme doplnili tuberkulinaci vyšetřením patologico-anatomickým a bakteriologickým. Sledovali jsme i spolehlivost intradermální tuberkulinace ve vztahu k pokročilosti tuberkulózních změn. Po vyřazení drůbeže pozitivně reagující a po dezinfekci aktivovaným Chloraminem B v 3% koncentraci byla tuberkulinace opakována za dva až tři měsíce. Chov drůbeže byl považován za prostý nákazy, jestliže při dvou tuberkulinacích provedených v intervalu tří měsíců nebyly zjištěny pozitivní reakce.

VÝSLEDKY

Při vyšetření 422 malochovů drůbeže byla prokázána tuberkulóza v 91 chovu, tj. ve 21,6 % (obr. 1). Z celkového počtu 6278 kusů vyšetřené drůbeže reagovalo pozitivně na aviární tuberkulin 279 kusů, tj. 4,3 %. Incidence do 5 % byla zjištěna v deseti chovech (tab. I). Přibližně v jedné třetině malochovů, které jsou nakaženy tuberkulózou, byla incidence této nákazy do 10 %, u další třetiny malochovů činila od 10 do 20 %

PREVALENCE



1. Procento výskytu tuberkulózy v chovech — Percent occurrence of tuberculosis in flocks

I. Prevalence TBC u drůbeže v malochovech — Prevalence of TBC in small flocks of poultry

Počet malochovů		Počet malochovů s výskytem TBC podle zamoření v procentech						Vyšetřeno drůbeže		
celkem	nakaže- ných TBC	0	0,1–5	5,1–10	10,1–20	20,1–50	>50	celkem	na tuberkulin	
									nega- tivní	pozi- tivní
422	91	331	10	23	30	25	3	6557	6278	279
100 %	21,6 %	78,4 %	2,4 %	5,5 %	7,1 %	5,9 %	0,7 %	100 %	96,7 %	4,3 %

a ve zbývající třetině byla zjištěna tuberkulóza u více než 20 % vyšetřované drůbeže.

Při bakteriologickém vyšetření drůbeže s patologicko-anatomickými změnami odpovídajícími tuberkulóze bylo izolováno 40 kmenů mykobakterií; všechny měly vlastnosti bakterie *Mycobacterium avium*. Při studiu spolehlivosti intradermální tuberkulinace jsme zjistili, že spolehlivost alergenodiagnostiky je výrazně ovlivněna dynamikou alergie po nakažení. U drůbeže vyšetřované v období pěti až osmi týdnů po nákaze byla spolehlivost intradermální tuberkulinace téměř 100 %. Naproti tomu u drůbeže s generalizovanou tuberkulózou jsme prokázali pozitivní reakce při intradermální tuberkulinaci pouze u 61 % kusů. Při sledování dynamiky alergie jsme během půl roku po nakažení zjistili při tuberkulinaci u jedné pětiny infikované drůbeže negativní výsledek.

Uvedený poznatek odpovídal i výsledkům, kterých jsme dosáhli při ozdravování drůbeže ze 40 malochovů, nakažené tuberkulózou s rozdílným stupněm promoření touto nákazou. Eliminací pozitivních reagentů se podařilo ozdravit chovy drůbeže s nízkým stupněm incidence tuberkulózy. Při výskytu reagentů na tuberkulin do 5 % byly ozdraveny dvě

II. Uplatnění eliminační metody při různém stupni zamoření malochovů drůbeže TBC — The use of the elimination method at different degrees of TBC infestation in small poultry flocks

Počet malochovů celkem	Výskyt reagentů v procentech	Počet malochovů	Průměrný počet drůbeže na jeden chov	Procento chovů				
				ozdravených po vyšetření				neozdrave- ných eliminační metodou
				1krát	2krát	3krát	4krát	
40	0,1— 5,0	3 100 %	25,3	66,7	33,3			0,0
	5,1—10,0	15 100 %	20,1	53,4	20,0	13,3		13,3
	10,1—20,0	12 100 %	18,4	33,4	25,0	8,3	8,3	25,0
	>20,0	10	18,2	20,0	20,0		20,0	40,0

třetiny těchto chovů již jednorázovým vyřazením drůbeže nakažené tuberkulózou (tab. II). K ozdravení zbývajících jedné třetiny chovu s uvedenou incidencí nákazy bylo třeba drůbež vyšetřit dvakrát. K dosažení nulové incidence reakcí na aviární tuberkulin v chovech drůbeže s výskytem reakcí od 6,1 do 10 % bylo možné eliminační metodou ozdravit 84,7 % vyšetřovaných chovů. Při výskytu pozitivních reakcí na tuberkulin u více než 20 % vyšetřované drůbeže selhala eliminační metoda i při opakovaných tuberkulinacích ve dvou pětinach chovů.

V pokusech bylo zjištěno, že nejlépe se osvědčila eliminační metoda při ozdravování chovů nakažených tuberkulózou při výskytu pozitivních reakcí na aviární tuberkulin do 5 %.

DISKUSE

Všeobecně se uznává, že na ozdravení tuberkulózní drůbeže se podílejí kromě spolehlivé diagnostiky i další faktory, zejména spolehlivá asanace prostředí. Při studiu uplatnění alergenodiagnostiky při ozdravení malochovů drůbeže se potvrdilo, že úspěch této metody závisí vedle dalších faktorů i na stupni promoření chovů touto nákazou. V chovech s výskytem pokročilé orgánové tuberkulózy je možnost ozdravení drůbeže menší, a to jednak pro sníženou spolehlivost alergenodiagnostiky, jednak pro značné promoření prostředí. Dosažené výsledky upřesňují údaje, které uvádějí Klimeš (1962) a další autoři, že eliminační metodu u drůbeže nakažené tuberkulózou je možné uplatnit v chovech s nízkou incidencí nákazy.

Při hodnocení epizootologické situace tuberkulózou nakažené drůbeže v malochovech jsme současně prokázali, že pro ohnisko tuberkulózy je rozhodující prostorová izolace jednotlivých chovů. V případě, že drůbež z několika malochovů má možnost se vzájemně stýkat, je nutné považovat za ohnisko nákazy skupinu chovů, které nejsou prostorově oddělené.

Literatura

DVORÁK, R.: Optimální koncentrace ptačího tuberkulinu a diagnostická spolehlivost tuberkulinace u slepic. *Vet. Med.*, Praha, 13, 1968, s. 403-408.

KARKADINOVSKAJA, I. A.: Tuberkulinovyje reakcii u kur. *Veterinarija*, 40, 1963, s. 32-36.

KLIMEŠ, B.: In: DRAŽAN, J. aj.: Tuberkulóza hospodářských zvířat. 1. vyd. Praha, Státní zemědělské nakladatelství 1962. 509 s.

PAVLAS, M.: Spolehlivost kapkové aglutinace při diagnostice tuberkulózy u drůbeže. *Vet. Med.*, Praha, 7, 1962, s. 43-52.

ROZAŇSKA, M.: Ocena aktyvnosti tuberkuliny ptasiej PPD. *Roczn. Nauk. roln.*, Ser. B, 70, 1960, s. 162-163.

ŠVRČEK, Š. — VRTIAK, O. J. — KAPITÁNČIK, B.: Štúdium diagnostiky a epizootologie aviárnej tuberkulózy. [Závěrečná správa.] Košice, Vysoká škola veterinárska 1965. 45 s.

VIOR, C.: Certari asupra valorii reactiei la tuberculina la pasari. *Probl. epizoot. vet.*, 9, 1960, s. 22-38.

Došlo dne 4. 9. 1981

ПАВЛАС, М. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Участие аллергенодиагностики в оздоровлении птицы из малых разведений, зараженных ТБЦ. *Vet. Med., Praha*, 26, 1981 (12) : 731-736.

Использование внутрикожной туберкулинизации в оздоровлении птицы из малых разведений, зараженной ТБЦ, с помощью метода элиминации, зависит от степени инвадированности птицы этой болезнью. Как показывают результаты, метод элиминации можно рекомендовать практике при инцидентности реакций на авиарный туберкулин в размере до 5—10 %. В метод входит и тщательная ассенизация среды после обработки зараженной птицы. При обнаружении реагентов на туберкулин до 5 % удалось оздоровить 2/3 малых разведений путем разовой браковки положительных реагентов. В разведениях с наличием положительных реакций в размере от 5,1 до 10 % с помощью метода элиминации было оздоровлено 84,7 % разведений, причем в некоторых случаях туберкулинизацию повторяли 3 раза, прежде чем добились свободного от болезни состояния. При наличии же положительных реакций в бьеме свыше 20 % оправдывает себя радикальный метод оздоровления, а именно браковка птицы и ассенизация среды.

ТБЦ, птицы; оздоровление малых разведений; туберкулинизация

PAVLAS, M. (Veterinary Research Institute, Brno): *The Use of Allergenodiagnosics in the Sanitation of Tuberculosis-Infected Poultry Kept in Small Flocks*. *Vet. Med., Praha*, 26, 1981 (12) : 731-736.

The use of intradermal tuberculinization during the sanitation of TBC-infected small flocks of poultry with the application of the elimination method depends on the extent to which the flock is infected. The results suggest that the elimination method can be recommended for practical use in cases of 5% to 10% incidence of reactions to avian tuberculin. Thorough sanitation of the environment after the elimination of the infected birds is an essential part of the elimination method. When the incidence of reagents to tuberculin was up to 5%, two thirds of the small flocks were successfully sanitized by the elimination of positive reagents in a single operation. In flocks with a positive-reaction incidence from 5.1 to 10%, the elimination method was successful in 84.7% of the treated stocks; in some cases the tuberculinization had to be repeated three times before an infection-free state was obtained. When the rate of positive reactions was above 20%, better results were obtained from a radical method based on the elimination of the poultry and sanitation of the environment.

avian tuberculosis; sanitation of small flocks; tuberculinization

PAVLAS, M. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Anwendung der Allergenodiagnostik bei der Heilung des Geflügels aus Kleinzuchten, das durch die Tuberkulose angesteckt wurde*. *Vet. Med., Praha*, 26, 1981 (12) : 731-736.

Die Anwendung der Intrahauttuberkulination bei der Heilung des Geflügels aus Kleinzuchten, das durch die Tuberkulose angesteckt wurde, mittels einer Eliminationsmethode hängt vom Grad der Verseuchung des Geflügels ab. Aus den erreichten Ergebnissen geht hervor, daß man die Eliminationsmethode für die Praxis bei der Inzidenz der Reaktionen auf Vogeltuberkulin bis 5—10 % empfehlen kann. Ein unentbehrlicher Bestandteil der Eliminationsmethode ist eine verlässliche Assanierung der Umwelt nach dem Ausmerzen des angesteckten Geflügels. Beim Vorkommen von Reagenzien auf Tuberkulin bis 5 % gelang es, zwei Drittel von Kleinzuchten durch eine einmalige Ausscheidung positiver Reagenzien zu heilen. In Zuchten mit der Inzidenz positiver Reaktionen bis 5,1—10 % wurden mittels der Eliminationsmethode 84,7 % Zuchten geheilt, wobei man in einigen Fällen die Tuberkulinisation dreimal wiederholen mußte, um den Zustand ohne Ansteckung zu erreichen. Beim Vorkommen positiver Reaktionen über 20 % bewährte sich zur Heilung von Zuchten des Geflügels besser eine radikale Methode, die in der Ausmerzungen des Geflügels und in der Assanierung der Umwelt bestand.

Tuberkulose des Geflügels; Heilung von Kleinzuchten; Tuberkulinisation

Adresa autora:

MVDr. Milan Pavlas, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

VÝSKYT ZEARELENONU A FUSARIÍ PRODUKUJÍCÍCH ZEARELENON V KRMIVECH

D. Veselá, D. Veselý, A. Adámková

VESELÁ, D. — VESELÝ, D. — ADÁMKOVÁ, A. (Ústav experimentální medicíny ČSAV, Olešnice v Orlických horách; Ústřední státní veterinární ústav, Praha): *Výskyt zearalenonu a fusarií produkujících zearalenon v krmivech*. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 737-741.

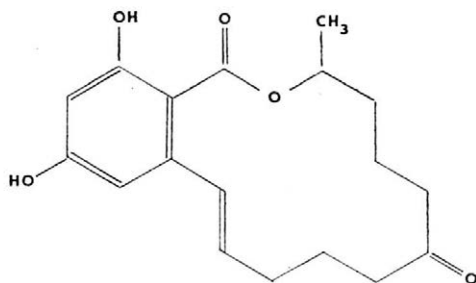
Ze sklizně roku 1980 jsme analyzovali na obsah zearalenonu 27 vzorků krmné pšenice viditelně napadené plísní. Zearalenon jsme našli v deseti vzorcích v množství 50 až 1300 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Z náhodně sebraných pěti vzorků peletovaných krmiv obsahoval jeden vzorek 14 mg zearalenonu v 1 kg. Z krmiv jsme izolovali 53 plísní rodu *Fusarium*. Z 19 plísní *F. graminearum* 15 produkovalo zearalenon, 11 plísní *F. culmorum* produkovalo zearalenon ve všech případech a ze dvou plísní *F. tricinctum* produkovala jedna zearalenon. Deset plísní *F. oxysporum*, osm plísní *F. sporotrichioides* a tři plísně *F. moniliforme* zearalenon neprodukovaly. Testované plísňe produkovaly za popsáných pokusných podmínek 200 až 1200 mg zearalenonu v 1 kg.

Fusarium; zearalenon; krmivo

Plísně rodu *Fusarium* často napadají obilí a seno sklizené za nepříznivých klimatických podmínek. Růst těchto plísní pokračuje při skladování vlhkých produktů. Fusaria produkují celou řadu toxických metabolitů, z nich z hlediska potravinářských surovin a krmiv nejdůležitější jsou trichotheceny (Veselý aj., 1979) a mykotoxiny s estrogenními účinky, reprezentované zearalenonem a jeho deriváty.

Zearalenon, nazývaný také F-2 toxin, je sekundárním metabolitem některých fusarií druhů *F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* a *F. moniliforme*.

Zearalenon je chemicky μ lakton 6-[10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl]- β -resorcylové kyseliny. Strukturní vzorec zearalenonu je na obr. 1.



1. Strukturní vzorec zearalenonu —
Structural formula of zearalenone

Akutní toxicita zearalenonu na teplokrevné živočichy a většinu mikroorganismů je velmi nízká. Estrogenní účinky zearalenonu jsou však popisovány v chovech hospodářských zvířat, zvláště prasat (Mirocha a Christensen, 1974). Zkrmování obilí napadeného fusarií, hlavně plísni *F. roseum*, se projevuje u mladých prasnic vulvovaginitidou. U nedospělých prasnic vede k vyhrěznutí vaginy a konečníku, ke zvětšení mléčných žláz a dělohy, spojenému s atrofiemi vaječníku. Ztráty při reprodukci prasat jsou zaviněny aborty, změněným ovulačním cyklem, neplodností, absorpcí plodu a sníženou laktací. Pokusně bylo prokázáno, že dávky 25 až 100 ppm zearalenonu v krmivu silně snižují reprodukční schopnosti prasnic (Chang aj., 1979). Dávka 6,61 ppm zearalenonu v krmivu dospívajících prasnic blokuje u poloviny pokusných zvířat sexuální cyklus (Shreeve aj., 1978). Ványi a Széky (1980) prokázali, že dávka 30 ppm zearalenonu vyvolává nejen esterogenní syndrom u prasnic, ale že také poškozuje spermatogenezu u samců.

Vulvovaginitida je popisována i u skotu. Po zkrmování plesnivého sena, ve kterém bylo nalezeno 14 ppm zearalenonu, se zvýšil u 150 krav inseminační index z hodnoty 1,2 na 4. Méně citlivá na účinky zearalenonu je drůbež. Zearalenon byl nalezen v krmivech z mnoha zemí v množství až 2,9 g.kg⁻¹ (Mirocha a Christensen, 1974).

Fusaria, která mohou produkovat zearalenon, napadají obilniny a píce i v našich zemích, zvláště za deštivých letních měsíců. V roce 1980 se vyskytovaly tyto plísně ve zvýšené míře, proto jsme hledali zearalenon a plísňe jej produkující v některých našich zemědělských produktech.

MATERIÁL A METODY

Vzorky některých krmiv jsme podrobili běžnému mykologickému vyšetření. Izolovaná fusaria, která mohou podle literatury syntetizovat zearalenon, jsme testovali na produkci tohoto mykotoxinu. Celkem 53 izoláty plísni jsme kultivovali na 30 g sterilní pšenice se 40 % vody při teplotě 25 °C po dobu 20 dní. Kultivace probíhala v Erlenmeyerových baňkách o objemu 300 ml, uzavřených vatovou zátkou. U jednoho kmene plísni *F. culmorum*, izolovaného ze sena, jsme sledovali produkci zearalenonu na původním substrátu. Jednu z plísni *F. culmorum* izolovanou ze sena jsme kultivovali na sterilním seně s přidávkou 200 % vody při teplotě 25 °C, druhou kultivaci na tomtéž substrátu jsme nechali proběhnout při venkovních teplotách. Kultivace začala 1. 9. 1980 a trvala 40 dní.

Vykultivané substráty okyselené 2 ml 1N-HCl jsme extrahovali v mixéru 5 minut 100 ml chloroformu. Suspenzi jsme přefiltrovali papírovým filtrem na Büchnerově nálevce a zbytek na filtru jsme promyli 50 ml chloroformu. Chloroformový filtrát jsme dvakrát extrahovali 50 ml 0,1N-NaOH v 1% chloridu sodném, extrakty jsme spojili a okyselili 1N-HCl na pH 2. Z okyseleného roztoku jsme zearalenon reextrahovali 2 x 50 ml chloroformu, chloroformový roztok vysušili filtrací přes bezvodý síran sodný a chloroform odpařili v laboratorním vakuovém odpařovači do sucha.

Suchý zbytek jsme rozpustili v 0,5 ml chloroformu a alikvotní podíl vzniklého roztoku jsme nanесли na start chromatografické desky Silufol (Kavalier) spolu se standardem zearalenonu. Chromatogram jsme vyvíjeli směsí chloroform : metanol (97 : 3) a po ukončení eluce jsme chromatogram nechali volně oschnout. Zearalenon jsme detekovali ozářením chromatogramu UV-světlem o vlnové délce 254 nm. Skvrna zearalenonu při ozáření UV-světlem modře fluoreskuje, $R_f = 0,50$. Po detekci UV-světlem jsme identifikovali zearalenon na chromatogramu ještě postřikem bis-diazotovaným benzidinem. Činidlo se připraví před použitím smícháním stejných objemů 0,5% roztoku benzidinu v 2M-HCl a 10% vodného roztoku dusitanu sodného. Skvrny zearalenonu na chromatogramu se po postřiku činidlem zbarví třech až čtyřech minutách. Zbarvení se vyvíjí za laboratorní teploty 10 až 15 minut.

Stejnou metodou jsme na obsah zearalenonu analyzovali vzorky krmné pšenice a peletovaných krmiv ze sklizní let 1979 a 1980.

Extrakt z testovaných plísní, obsahující zearalenon, jsme přechistili na sloupci Kieselgelu H (Merck) a získaný zearalenon dvakrát překrystalizovali z horkého benzenu. Čistotu izolovaného zearalenonu jsme ověřili tenkovrstvou chromatografií, spektrofotometrickým proměřením metanolového roztoku v UV-světle a bodem tání.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Ze pšenice, peletovaných krmných směsí, sena a slámy jsme izolovali celkem 53 fusaria druhů *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* a *F. tricinctum*, které jsou potenciálními producenty zearalenonu. Z 19 plísní *F. graminearum* 15 produkovalo zearalenon, 11 plísní *F. culmorum* jej produkovalo ve všech případech. Deset plísní *F. oxysporum*, osm plísní *F. sporotrichioides* a tři plísně *F. moniliforme* zearalenon neprodukovaly. Ze dvou plísní *F. tricinctum* jedna produkovala zearalenon.

Produkční schopnost testovaných plísní kultivovaných na pšenici se pohybovala v rozmezí od 200 do 1200 mg zearalenonu na kilogram substrátu. Plíseň *F. culmorum* izolovaná ze sena dosáhla maximální produkce 25 mg zearalenonu na kilogram tohoto substrátu po osmi dnech kultivace při teplotě 25 °C. Za venkovních teplot produkovala plíseň nejvíce zearalenonu po 20 dnech kultivace (10 mg . kg⁻¹).

V roce 1979 jsme analyzovali 40 vzorků krmiv. Zearalenon jsme našli v jednom vzorku směsného krmiva v množství 1 mg . kg⁻¹.

Na podzim roku 1980 jsme analyzovali na obsah zearalenonu 27 vzorků krmné pšenice a pět vzorků peletovaných krmiv. U krmné pšenice jsme se zaměřili na vzorky viditelně napadené plísněmi. Zearalenon jsme našli v deseti vzorcích v množství 50 až 1300 µg v 1 kg pšenice. V peletovaných krmivech jsme našli jeden vzorek obsahující 14 mg zearalenonu v 1 kg substrátu. Uvedené krmivo obsahovalo 40 % ječmene, 16 % ovsu a 5,5 % pšeničných otrub.

Analyzované vzorky jsme extrahovali po okyselení vzorku chloroformem za laboratorní teploty. Extrakce v Soxhletově extraktoru, kterou doporučují Laszity a Wöller (1977), je náročnější na čas a zařízení. K čištění chloroformového extraktu před tenkovrstvou chromatografií jsme použili upraveného postupu podle Mirochy aj. (1974). Přídavek 1 % chloridu sodného v 0,1N-NaOH omezuje vznik emulze, která ztěžuje rozdělení fází.

Eluce chromatogramu směsí chloroform:metanol (97:3) byla vhodnější než literaturou často doporučovaná soustava chloroform:metanol (99:1), u které je na Silufolu $R_f = 0,15$. Osvědčily se také eluční směsi benzen: kyselina octová (95:5), $R_f = 0,11$; benzen: aceton (12:7), $R_f = 0,89$, *n*-hexan: dietyléter: kyselina octová (70:30:2), $R_f = 0,76$.

Detekce zearalenonu na chromatogramu bis-diazotovaným benzidinem podle Malaiyanda aj. (1976) je výhodná zvláště při analýze přirozených materiálů. Autoři uvádějí jako mez detekce 2 ng zearalenonu na skvrnu. Podle našich zkušeností je mez citlivosti této detekce přibližně stejná jako pod UV-světlem o vlnové délce 254 nm, 0,02 µg zearalenonu na skvrnu. Uvedenou metodou lze stanovit minimálně 20 µg zearalenonu v 1 kg pšenice.

Zearalenon izolovaný z testovaných plísní tvořil bezbarvé krystalky rozpustné v chloroformu, metanolu, etanolu a dietyléteru, nerozpustné ve vodě a *n*-hexanu. Extinkční maxima metanolového roztoku v UV-světle jsou při vlnových délkách 236, 274 a 316 nm, bod tání preparátu byl 163 — 164 °C, což je ve shodě s údaji autorů Pathre aj. [1979]. Chromatograficky byl připravený zearalenon jednotnou sloučeninou se stejnými vlastnostmi jako použitý standard.

Nálezy zearalenonu v našich zemědělských produktech v množství až 14 mg v 1 kg dokazují nutnost sledovat tento mykotoxin především v krmivu určeném pro prasata a hovězí dobytek. Z mykologického a chemického rozboru krmiv je zřejmé, že největšími producenty zearalenonu u nás jsou plísně *F. culmorum* a *F. graminearum*.

Poděkování:

Autoři děkují prof. C. J. Mirochovi, Department of Plant Pathology, University of Minnesota, Saint Paul, Minnesota 55108, USA, za laskavé poskytnutí standardu zearalenonu a RNDr. O. Fassatiové, CSc., z přírodovědecké fakulty UK v Praze za mykologické určení některých plísní.

Literatura

CHANG, K. — KURTZ, H. J. — MIROCHA, C. J.: Effects of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction. *Am. J. vet. Res.*, 40, 1979, č. 9, s. 1260-1267.

LASZTITY, R. — WÖLLER, L.: Investigation of the effect of zearalenone toxin produced by *Fusarium* fungi and its derivatives on animal organisms fed with infested fodder. *Zesz. probl. Postep. Nauk roln.*, Warsz., 1977, s. 189-199.

MALAIYANDI, M. — BARRETTE, J. P. — WAVROCK, P. L.: Bis-diazotized benzidine as a spray reagent for detecting zearalenone on thin layer chromatoplates. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 59, 1976, č. 5, s. 959-962.

MIROCHA, C. J. — CHRISTENSEN, C. M.: Oestrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium*. *Mycotoxins*, I. F. H. Purchase (ed), Amsterdam, Elsevier Press 1974, s. 129-148.

MIROCHA, C. J. — SCHAUERHAMER, B. — PATHRE, S. V.: Isolation, detection, and quantitation of zearalenone in maize and barley. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 57, 1974, č. 5, s. 1104-1110.

PATHRE, S. V. — MIROCHA, C. J. — FENTON, S. W.: Criteria of purity for zearalenone standards. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 62, 1979, č. 6, s. 1268-1273.

SHREEVE, B. J. — PATTERSON, D. S. P. — ROBERTS, B. A. — WRATHALL, A. E.: Effect of mouldy feed containing zearalenone of pregnant sows. *Br. vet. J.*, 134, 1978, č. 5, s. 421-427.

VÁNYI, A. — SZÉKY, A.: Fusariotoxicoses. VI. The effect of F-2 toxin (zearalenone) on the spermatogenesis of male swine. *Magy. Allatorv. Lap.*, 35, 1980, č. 4, s. 242-246.

VESELÝ, D. — VESELÁ, D. — RITTER, J.: Výskyt toxigenního kmene *Fusarium tricinum* v souvislosti s onemocněním dojnice. *Vet. Med.*, Praha, 24, 1979, č. 7, s. 397-402.

Došlo dne 28. 4. 1981

ВЕСЕЛА, Д. — ВЕСЕЛЫ, Д. — АДАМКОВА, А. (Институт экспериментальной медицины, при АН ЧССР, Олешнице в Орlických horách; Центральный государственный институт ветеринарии, Прага): Наличие зеараленона и фузариий, продуцирующих зеараленон в кормах. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 737-741.

На основе урожая за 1980 г. анализировали на содержание зеараленона 27 образцов кормовой пшеницы, явно пораженной плесенью. Зеараленон обнаружен в 10 образцах в количестве от 50 до 1300 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. В 5 отобранных по методу случайной выборки образцах пелетированных кормов в одном образце было 14 мг зеараленона в 1 кг. У кормов изолировали 53 плесени сем. Фузариум. Из 19 плесеней *F. graminearum* 15 продуцировали зеараленон, 11 *F. culmorum* продуцировали зеараленон во всех случаях, а из 2 плесеней *F. tricinctum* его продуцировала лишь одна. Зеараленон не продуцировали 10 плесеней *F. oxysporum*, 8 плесеней *F. sporotrichioides* и 3 плесени *F. moniliforme*. Отестированные плесени продуцировали в описанных экспериментальных условиях 200–1200 мг зеараленона в 1 кг.

Фузариум; зеараленон; корм

VESELÁ, D. — VESELÝ, D. — ADÁMKOVÁ, A. (Institute of Experimental Medicine, Czechoslovak Academy of Sciences, Olešnice v Orlických horách; Central State Veterinary Institute, Praha): The Occurrence of Zearalenone and Zearalenone-producing Fusaria in Feeds. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 737-741.

Twenty-seven samples of fodder wheat from the 1980 harvest, visibly attacked by mould, were analyzed for the content of zearalenone. Zearalenone was found to be present in ten samples and its content ranged from 50 to 1300 μg per kg. One of the five samples of pelleted feeds, taken at random, contained 14 mg zearalenone per kg. Fifty-three moulds of the genus *Fusarium* were isolated from the feeds. Among the 19 moulds of *F. graminearum*, 15 produced zearalenone; 11 moulds of *F. culmorum* produced zearalenone in all cases, and of the two moulds of *F. tricinctum* one produced zearalenone. Ten moulds of *F. oxysporum*, eight moulds of *F. sporotrichioides* and three moulds of *F. moniliforme* did not produce any zearalenone. Under the described conditions the tested moulds produced 200 to 1200 mg of zearalenone per 1 kg.

Fusarium; zearalenone; feed

VESELÁ, D. — VESELÝ, D. — ADÁMKOVÁ, A. — (Institut für experimentelle Medizin der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Olešnice v Orlických horách; Zentrales Staatsinstitut für Veterinärmedizin, Praha): Vorkommen von Zearalenon und Fusarien, die Zearalenon in Futtermitteln produzieren. Vet. Med., Praha, 26, 1981 (12) : 737-741.

Aus der Ernte 1980 wurden auf den Gehalt an Zearalenon 27 Proben von Futterweizen, die durch den Schimmel sichtbar befallen wurden, analysiert. Zearalenon wurde in zehn Proben in der Menge von 50 bis 1300 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ gefunden. Von den zufällig gesammelten fünf Proben von Pelletfuttermitteln enthielt eine Probe 14 mg Zearalenon in 1 kg. Aus den Futtermitteln wurden 53 Schimmel der Gattung *Fusarium* isoliert. Von den 19 Schimmeln *F. graminearum* produzierten 15 Zearalenon, 11 Schimmel *F. culmorum* produzierten Zearalenon in allen Fällen und von den zwei Schimmeln *F. tricinctum* produzierte eine Zearalenon. Zehn Schimmel *F. oxysporum*, acht Schimmel *F. sporotrichioides* und drei Schimmel *F. moniliforme* produzierten kein Zearalenon. Die getesteten Schimmel produzierten unter den beschriebenen Bedingungen 200 bis 1200 mg Zearalenon in 1 kg.

Fusarium; Zearalenon; Futtermittel

Adresy autorů:

Ing. Doubravka Veselá, ing. Drahomír Veselý, Ústav experimentální medicíny ČSAV, 517 83 Olešnice v Orlických horách 14
RNDr. Alena Adámková, Ústřední státní veterinární ústav, Sídlištní 156, 165 03 Praha 6 - Lysolaje

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 1/1982 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny články:

- J. Štěpánek, P. Menšík, J. Menšík, J. Franz, B. Šmíd, L. Valíček: Diagnostika bovinního koronaviru pomocí suspenzí myších erytrocytů stabilizovaných formalinem
- J. Franz, J. Hampl, J. Štěpánek, A. Holub, J. Menšík, M. Sedláček: Sekrece imunoglobulinů v orgánech prasečích fétů v systému *in vitro*
- A. Mikulík, R. Dvořák, L. Knesel, M. Vávrová, I. Žoldošová: Vliv přídavku Rumensinu v dietě býčků na kvalitu jejich masa
- J. Lukášová, L. Němcová, M. Schánělová: Lipolytické mikroorganismy v játrových výrobcích
- L. Němeček, P. Hron, S. Roth: Narkóza psa a kočky Althesinem
- M. Otčenášek, J. Mátl, J. Vítovec, P. Vladík, J. Wohlman: Maduromykotický mycetom koně
- M. Krajčovičová, O. Dibák: Utilizácia bielkovín u potkanov pri rôznom príjme tukov a sacharidov
- L. Itze, O. Dobšínský, J. R. Reichl, B. Rotschild: Intestinální transport aminokyselin

Menšík J., Pospíšil Z., Rozkošný V., Machatková M., Machatý J., Vlček Z.: Detekce virů PI-3, BVD-MD a parvoviru, persistujících v bovinních fětech po experimentální intrauterinní infekci	701
Menšík J., Pospíšil Z., Rozkošný V., Machatková M., Machatý J., Vlček Z.: Multiplikace virů IBR, PI-3 a BVD-MD v buněčných a orgánových kulturách připravených z hovězích fětů po experimentální intrauterinní infekci	709
Chroustová E.: Diagnostika experimentální cysticercózy skotu ELISA testem	721
Pavlas M.: Uplatnění alergenodiagnostiky při ozdravování tuberkulózu nakažené drůbeže z malochovů	731
Veselá D., Veselý D., Adámková A.: Výskyt zearalenonu a fusarií produkujících zearalenon v krmivech	737

СОДЕРЖАНИЕ

Меншик Я., Поспишил З., Розкошны В., Махаткова М., Махаты Й., Влчек З.: Детектирование вирусов PI-3, BVD-MD и парвовируса, остающихся в бовинных фетах после экспериментального внутриматочного заражения	709
Меншик Я., Поспишил З., Розкошны В., Махаткова М., Махаты Й., Влчек З.: Мультипликация вирусов IBR, PI-3 и BVD-MD в клетках органов и культур, приготовленных из говяжьих фетов после экспериментального внутриматочного заражения	709
Хроустова Э.: Диагностика экспериментального цистицеркоза крупного рогатого скота с помощью ELISA-теста	721
Павлас М.: Участие алергенодиагностики в оздоровлении птицы из малых разведений, зараженных ТБЦ	731
Весела Д., Веселы Д., Адамкова А.: Наличие зearаленона и фузари, продуцирующих зearаленон в кормах	737

CONTENTS

Menšík J., Pospíšil Z., Rozkošný V., Machatková M., Machatý J., Vlček Z.: The Detection of the PI-3 and BVD-MD Viruses and Parvovirus Persisting in Bovine Foetuses after Experimental Intrauterine Infection	701
Menšík J., Pospíšil Z., Rozkošný V., Machatková M., Machatý J., Vlček Z.: Multiplication of the IBR, PI-3 and BVD-MD Viruses in Cell and Organ Cultures Prepared from Bovine Foetuses after Experimental Intrauterine Infection	709
Chroustová E.: Diagnosis of Experimental Bovine Cysticercosis by the ELISA Method	721
Pavlas M.: The Use of Allergenodiagnosics in the Sanitation of Tuberculosis-Infected Poultry Kept in Small Flocks	731
Veselá D., Veselý D., Adámková A.: The Occurrence of Zearalenone and Zearalenone-producing Fusaria in Feeds	737

Menšík J., Pospíšil Z., Rozkošný V., Machatková M., Machatý J., Vlček Z.: Detekce der Viren PI-3, BVD-MD und des Parvovirus, die in den bovinen Feten nach der experimentellen intrauterinen Infektion persistieren	701
Menšík J., Pospíšil Z., Rozkošný V., Machatková M., Machatý J., Vlček Z.: Multiplikation der Viren IBR, PI-3 und BVD-MD in Zellen- und Organkulturen, die aus Rindfeten nach der experimentellen intrauterinen Infektion vorbereitet wurden	709
Chroustová E.: Diagnostik der experimentellen Zystizerkose von Rindvieh durch den ELISA-Test	721
Pavlas M.: Anwendung der Allergenodiagnostik bei der Heilung des Geflügels aus Kleinzuchten, das durch die Tuberkulose angesteckt wurde	731
Veselá D., Veselý D., Adámková A.: Vorkommen von Zearalenon und Fusarien, die Zearalenon in Futtermitteln produzieren	737

Rukopisy odevzdány k tisku 16. 9. 1981 — Podepsáno k tisku 26. 11. 1981



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