

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

7

ROČNÍK 30 (LVIII)
PRAHA
ČERVENEC 1985
CENA 10 Kčs
CS ISSN 0590-5214

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

Vědecký časopis

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Rídí redakční rada:

akademik Otto Jaroslav Vrtiak (předseda), akademik Kolo-
man Boďa, MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., prof. MVDr. Ján
Elečko, CSc., MVDr. Miloš Halaša, CSc., prof. MVDr. Jozef
Hrušovský, DrSc., prof. MVDr. Dagmar Ježková, DrSc.,
doc. MVDr. Evžen Jurák, CSc., prof. MVDr. Ladislav Po-
lák, CSc., MVDr. Josef Straka, CSc., prof. MVDr. Bohumil
Ševčík, DrSc.

Za vedení časopisu odpovídá akademik Otto Jaroslav Vrtiak

Redaktorka ing. Jovanka Václavíčková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství,
Praha 1985

■

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje stu-
die, rozboru a vědecká pojednání o vyřešených úkolech vý-
zkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Českosloven-
ská akademie zemědělská — Ústav vědeckotechnických in-
formací pro zemědělství. Vychází měsíčně. Redakce: 120 56
Praha 2, Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné
Kčs 120,—.

■

Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзо-
ры, анализы и научные статьи о решенных задачах по науч-
ному исследованию в области ветеринарии. Издает Чехословацкая
сельскохозяйственная академия — Институт научно-технической
информации по сельскому хозяйству. — Выход в свет ежемесячно.
Редакция 120 56 Прага 2, Слезка 7.

■

The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publishes
studies, analyses and scientific treatises about the solved
research tasks in the line of the veterinary medicine. Pu-
blished by the Czechoslovak Academy of Agriculture — In-
stitute of Scientific and Technical Information for Agricul-
ture. Issued monthly. Editorial office 120 56 Prague 2, Slez-
ská 7.

■

Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍ-
NA veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche
Abhandlungen über die gelösten Forschungsaufgaben aus
dem Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben von der
Tschechoslowakischen landwirtschaftlichen Akademie — In-
stitut für wissenschaftlich-technische Information der Land-
wirtschaft. Erscheint monatlich. Redaktion 120 56 Prag 2,
Slezská 7.

TERMOREZISTENTNÍ TEST SPERMIÍ A PLODNOST BÝKŮ

J. Kozumplík, J. Sosnová

KOZUMPLÍK, J. — SOSNOVÁ, J. (Vysoká škola veterinární, Brno; Okresní veterinární zařízení, Plzeň): *Termorezistentní test spermií a plodnost býků*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 385-392.

Sledovali jsme spermioqram 17 býků a u 160 ejakulátů jsme hodnotili přežitelnost spermií po rozmrazení pomocí termorezistentního testu (38 °C). Po první inseminaci 10 682 plemenic byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi fertilizační schopností ejakulátů s různou hodnotou termorezistentního testu. Nejlepší fertilizační schopnost spermií byla zaznamenána u ejakulátů, v nichž se udržel progresivní pohyb po dvou hodinách termorezistentního testu u 40 % spermií. Z 1496 inseminovaných plemenic zabřezlo 971 kusů, tj. 64,9 %, zatímco po inseminaci 4216 plemenic při použití semene s progresivním pohybem, zjištěným u 30 % spermií na konci testu, jich zabřezlo 2403, tj. 56,98 %, což je statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Se snižující se aktivitou spermií byla plodnost po první inseminaci ještě nižší. I když byl určitý rozdíl v individuální plodnosti plemeníků (54 až 67 %), byl kladný vztah mezi výsledky termorezistentního testu a dosahovanou plodností zjišťován u všech plemeníků.

býk; zmrazené semeno; přežitelnost spermií; fertilizační schopnost

Významnou metodou reprodukce, která umožňuje zavádět různé biotechnické metody v chovech hospodářských zvířat, je umělá inseminace. Využití předností této metody v chovu skotu se ještě zvýšilo, když byla úspěšně vyřešena dlouhodobá konzervace spermií. V souvislosti s možností uchovávat mrazené sperma býka několik let se zvýšily požadavky nejen na hygienu odběru a zpracování semene, ale i na další kvalitativní ukazatele, podmiňující dobrou fertilizační schopnost spermatu po rozmrazení. Za tím účelem je ejakulát býků posuzován řadou laboratorních testů tak, aby výsledné hodnocení odpovídalo požadavkům uvedeným v ČSN 46 7111. Obdobné normy jsou vypracovány i v jiných státech (např. TGL-22264-82), což vede k tomu, že v rámci inseminace jsou k dlouhodobému uchovávání používány ejakuláty s relativně stejnými vlastnostmi. V poslední době se však stále víc zdůrazňuje rozdílná okamžitá nebo celoživotní plodnost jednotlivých plemeníků, a to nejen u skotu, ale i u dalších zvířat. Odpovídající výsledky testů s nativním semenem jsou určitou zárukou předpokládané fertilizační schopnosti ejakulátu, ale nevyjadřují rozdíly v míře oplozovací schopnosti spermií. Tyto rozdíly je možné do velké míry zjišťovat penetračním testem (Majerčíak aj., 1982; Babušík, 1982 a jiní) nebo hodnocením změn proakrozinu a akrozinu (Šrámek, 1981; Petelíková aj., 1983; Šrámek aj., 1984), popřípadě dalšími testy, které citlivěji zaznamenávají biochemické změny semenné plazmy, a tím vyjadřují porušení povrchových membrán spermií (Kozumplík, 1977; Smutná, 1980 a jiní). Mnohé z uvedených metod jsou náročné na přístrojové vybavení a na čas, což brání širšímu a rutinnímu využití v praxi. Vzhledem k tomu,

že u každého plemeníka je možné počítat se změnou kvality ejakulátu, nelze výsledky jednoho vyšetření semene vztahovat na ejakulát druhý, a to ani tehdy, když byl získán v relativně krátkém časovém odstupu. Proto se stále hledají jednoduché metody laboratorního vyšetření, které by bylo možné zařadit jako součást pravidelného hodnocení spermatu před rozmrazením nebo po něm [Mudra aj., 1975; Linford aj., 1976 a jiní]. V této souvislosti se relativně často dává do vztahu fertilizační schopnost s funkční potencialitou hodnocenou různými — nejčastěji teplotními — testy [Věžník a Hruška, 1974; Jondet aj., 1978; Vinkler, 1980].

V této práci jsme si dali za úkol posoudit výsledky termorezistentního testu spermií po rozmrazení pelet ve vztahu k dosahované plodnosti býků. Pokusy byly provedeny ve spolupráci s Krajským plemenářským podnikem u býků testantů, u nichž je možné přesně zjistit plodnost dosahovanou z jednotlivě evidovaných ejakulátů.

MATERIÁL A METODA

Do pokusu bylo zařazeno 17 plemenných býků ve věku 12 až 13 měsíců, určených k testovacímu připařování v rámci pěti okresů jednoho kraje. V průběhu tří měsíců bylo podle ČSN 46 7111 vyhodnoceno celkem 178 ejakulátů, z nichž požadavkům normy odpovídalo 160 ejakulátů. Ze 160 ejakulátů bylo po rozmrazení použito 156, čímž byla vytvořena dostatečná zásoba inseminačních dávek (v průměru 1500 na jednoho plemeníka) určených k testaci. Kromě předepsaného hodnocení spermatu byla po rozmrazení kontrolních pelet mikroskopicky sledována aktivita spermií v rámci termorezistentního testu. Při tomto testu bylo rozmrazené semeno ponecháno v tobole z PVC v termostatu (38 °C) a aktivita spermií byla posuzována ještě za 30, 60 a 120 minut stejným způsobem, jaký je předepsán pro hodnocení aktivity spermií po rozmrazení. Plodnost plemeníků byla sledována nejen celkově, ale i vzhledem k jednotlivým ejakulátům, aby bylo možné posoudit vztah termorezistentního testu k dosahované plodnosti. Procento březosti po první inseminaci bylo celkem vyhodnoceno u 10 153 plemenic ustájených ve 101 zemědělském závodě. Gravidita byla zjišťována ve třetím měsíci po inseminaci.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V rámci našeho šetření bylo hodnoceno 156 ejakulátů, tj. v průměru 9,35 ejakulátu na jednoho plemeníka (7—12). Hodnoty ukazatelů čerstvého ejakulátu plně odpovídaly normě a nejsou zvlášť posuzovány. Ihned po rozmrazení kontrolních pelet z každého spermatu bylo zjištěno, že v 55,8 % ejakulátů (87) je zjišťován u 30 % spermií progresivní pohyb, zatímco u 69 ejakulátů (44,2 %) je zjišťována aktivita u 40 % spermií. Ani u jednoho plemeníka nebyl zjištěn ihned po rozmrazení kontrolních pelet progresivní pohyb spermií jen v hodnotách 30 % nebo jen v hodnotách 40 %. V rámci daného souboru však existovali plemeníci s trvale vyšší aktivitou (převaha 40% aktivity) spermií, stejně jako s trvale nižší aktivitou (převaha 30% aktivity). Tato skutečnost však má jen malý vliv na dosahovanou plodnost, což je patrné z tab. I. Rozdělíme-li výsledky v této tabulce na dvě části podle průměrně zjišťované aktivity spermií, pak plemeníci s aktivitou nad 35 % dosahují v průměru vyšší plodnosti (62,2 %) než býci s aktivitou pod 35 % (59,8 %). Kolísání krajních hodnot je však relativně velké, což je patrné z toho, že plemenný býk BO 742 s průměrnou aktivitou 32,0 % má po první inseminaci nejvyšší plodnost z celého souboru. Rozdíly mezi dosahovanou plodností obou skupin nejsou proto statisticky významné. Prů-

I. Aktivita spermií bezprostředně po rozmrazení a plodnost býků po první inseminaci — Sperm activity immediately after thawing and the fertility of bulls after the first insemination

Státní registrace býka	Počet vyšetřených ejakulátů	Průměrné procento aktivity spermií	Průměrné procento plodnosti býků
FZ 91	9	31,11	59,4
RAK 79	8	31,25	59,4
BJR 43	7	31,42	61,9
BO 740	12	31,66	61,1
BO 743	11	31,81	57,4
BO 742	10	32,00	67,2
BJR 44	11	32,72	55,0
BJR 15	7	32,85	58,7
BJR 16	7	34,28	58,2
REZ 90	11	35,45	54,3
FZ 86	11	35,45	59,6
FZ 80	9	35,55	63,5
REZ 103	10	37,00	63,7
REZ 69	11	37,00	64,5
REZ 89	8	38,75	63,2
REZ 75	8	38,75	62,8
REZ 70	9	38,88	65,7

měrná vyšší plodnost plemeníků s lepší aktivitou spermií bezprostředně po rozmrazení má proto jen orientační charakter, který však naznačuje, že by dané hledisko mohlo mít větší platnost a hodnotu po objektivnějším posouzení, což se stalo ve spojitosti s termorezistentním testem. Z rozboru údajů termorezistentního testu a výsledků plodnosti jednotlivých ejakulátů posuzovaného souboru plemeníků vyplývá, že mezi posuzovanými hledisky existují pozitivní vztahy. Z tab. II, která představuje protokolární zpracování údajů od každého plemeníka, je patrné, že mezi výsledkem termorezistentního testu a dosahovanou plodností je v krajních hodnotách přímý vztah. Nejlepší procento březosti bylo zaznamenáno v případech, kdy aktivita spermií na konci termorezistentního testu neklesla pod 40 %, a nejhorší výsledky byly zjištěny v případě, kdy aktivita spermií již za hodinu klesla na 20 %. Z uvedeného zjištění je patrné, že fertilizační schopnost jednotlivých ejakulátů jednoho a téhož plemeníka není zcela vyrovnaná. Charakter kolísání motility spermií v rámci termorezistentního testu je výrazem funkčních vlastností spermií a odpovídá i výslednému kolísání plodnosti. Sperma plemeníka REZ 90, který je uváděn jako příklad v tab. II, bylo použito ve dvou okresech v několika zemědělských závodech, což vylučuje jednostranné ovlivňování dosažených výsledků. Stejný systém byl používán i v případech, kdy byly hodnoceny schopnosti ejakulátů dalších plemeníků.

V průběhu testování plemenných býků bylo zjištěno, že nejlepších výsledků bylo dosahováno v okrese RO (68,55 %) z 1352 prvních in-

II. Protokolární záznam hodnocených ukazatelů u býka REZ 90 — Protocolar record of the studied parameters in the REZ 90 bull

Číslo skoku	Hodnoty čerstvého ejakulátu			Aktivita spermií ihned po rozmrazení	Termorezistentní test — aktivita spermií v procentech za			Procento abnormálních spermií v čerstvém ejakulátu	První inseminace plemenic <i>n/zabřezlo</i>	Procento březosti
	(%) aktivita	spermie $10^{12}/l$	objem ml		30 min	60 min	120 min			
28 04 82	70	1,3	4	30	30	30	30	8,5	76/43	56,6
05 05 82	80	1,1	7	40	40	30	30	10,0	81/43	53,1
12 05 82	80	1,4	5	30	30	30	30	8,5	56/29	51,8
19 05 82	80	1,4	5	40	40	40	30	8,5	59/36	61,0
27 05 82	70	1,1	5	30	30	20	20	8,0	54/23	42,5
02 06 82	80	1,9	5	40	40	50	40	6,0	90/75	83,3
16 06 82	70	1,1	4	30	40	40	30	8,0	23/16	69,5
23 06 82	80	1,0	5	40	40	30	30	9,0	32/18	56,2
30 06 82	80	1,3	3	40	40	50	40	6,0	11/ 8	72,7
07 07 82	80	1,3	3	40	40	30	30	11,0	41/21	51,2

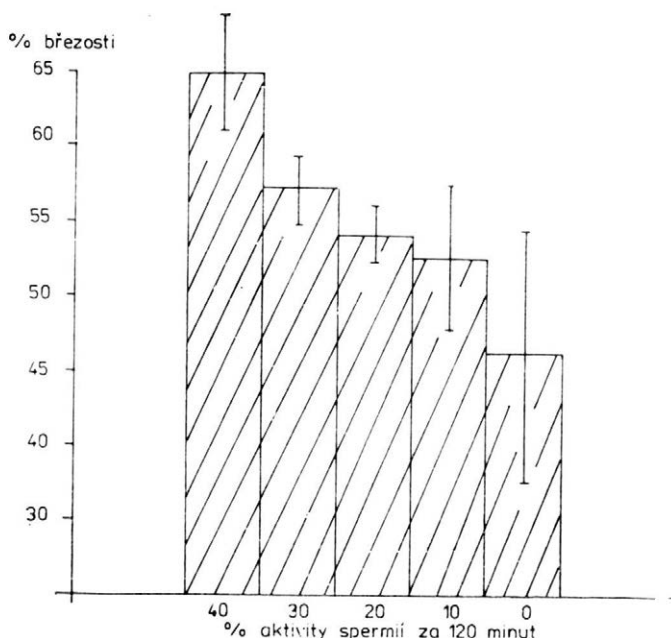
seminací a nejhorších v okrese Pl.-s. (51,4 %) z 2204 prvních inseminací. Mezi uvedenými okresy jsou podobné rozdíly zjišťovány již po několik let, což svědčí o trvaleji působících faktorech. Ze statistického vyhodnocení sledovaných ukazatelů však v obou okresech také vyplývají úzké vztahy mezi přežitelností spermií a plodností. Tak v okrese RO byla zaznamenána po ejakulátech s 40% aktivitou spermií na konci rezistentního testu v průměru $69,57 \pm 7,2\%$ březost, s 30% aktivitou $66,46 \pm 4,11\%$ březost, s 20% aktivitou $63,33 \pm 4,51\%$ březost a s 10% aktivitou spermií $56,18 \pm 1,90\%$ březost. Statisticky významný rozdíl ($p_{0,05}$) byl zjištěn mezi březostí, které bylo dosaženo s ejakuláty se 40 a 30% aktivitou spermií, a březostí, které bylo dosaženo s ejakuláty s 10% aktivitou. V okrese Pl.-s. byla zjištěna po ejakulátech se 40% aktivitou spermií březost v průměru u $62,81 \pm 10,64\%$ plemenic, s 30% aktivitou u $55,75 \pm 5,69\%$, s 20% aktivitou u $53,49 \pm 12,42\%$ a s 10% aktivitou u $38,55 \pm 14,74\%$ plemenic. Srovnáním výsledků ve stejných kategoriích byly zjištěny rozdíly ještě výraznější ($p_{0,01}$). V obou okresech nebyl k inseminaci použit ejakulát s nulovou aktivitou spermií na konci termorezistentního testu.

Z rozboru uvedených výsledků vyplývá, že i když plodnost po první inseminaci může být ovlivněna dlouhodobě rozdílně působícími faktory (úroveň péče o plemence a reprodukční proces atd.), je vždy patrný přímý vztah mezi dobou přežitelnosti spermií zjišťovanou dvouhodinovým termorezistentním testem a mezi plodností. Ejakuláty s malým počtem (0–10 %) progresivně se pohybujících spermií na konci termorezistentního testu by neměly být k inseminaci používány.

Zpracováním výsledků celého souboru posuzovaných plemenků vynikly ještě zřetelněji sledované vztahy mezi přežitelností spermií po

III. Vztah aktivity spermií v rámci termorezistentního testu po rozmrazení k dosahované plodnosti — The relation between sperm activity in thermoresistance test after thawing and fertility

Počet ejakulátů	Hodnoty čerstvého spermatu			Aktivita spermií v procentech po rozmrazení za 120 minut	Procento abnormálních čerstvých spermií	První inseminace (počet)		Procento březosti
	aktivita %	spermie $10^{12}/l$	objem ml			plemenic	březích	
20	$78,50 \pm 3,66$	$1,37 \pm 0,42$	$5,30 \pm 2,61$	40	$6,47 \pm 1,68$	1496	971	64,90
65	$76,60 \pm 15,61$	$1,43 \pm 0,26$	$4,44 \pm 1,29$	30	$8,53 \pm 3,09$	4216	2403	56,98
42	$76,66 \pm 4,77$	$1,59 \pm 0,16$	$4,95 \pm 1,16$	20	$8,82 \pm 0,77$	2752	1483	53,87
27	$75,18 \pm 5,09$	$1,49 \pm 0,32$	$4,81 \pm 1,98$	10	$7,27 \pm 3,56$	1552	813	52,38
2	$80,00 \pm 0,00$	$1,70 \pm 0,14$	$5,00 \pm 2,82$	0	$10,75 \pm 3,18$	137	63	45,98



1. Významnost vlivu aktivity spermií za 120 minut po rozmrazení na zabřezávání plemenic, vyjádřené horní a spodní mezí spolehlivosti na úrovni $p_{0,05}$ — The significance of the effect of sperm activity 120 minutes after thawing on the conception of dams, expressed by the upper and lower confidence limits at the level of $p_{0,05}$

rozmrazení, hodnocenou testem termorezistence, a dosahovanou plodností. V tab. III jsou seřazeny údaje podle výsledné hodnoty termorezistentního testu, bez ohledu na plemeníka. V obr. 1 jsou získané výsledky vyjádřeny pomocí horní a spodní meze spolehlivosti a t -testem, z čehož jasně vyplývá, že je statisticky významný rozdíl ($p_{0,05}$) v graviditě plemenic po první inseminaci mezi semenem, v němž se na konci termorezistentního testu pohybovalo nejméně 40 % spermií, a semenem s nižší pohyblivostí spermií. Statisticky nevýznamný rozdíl však byl zjišťován mezi plodností dosaženou inseminačními dávkami z ejakulátů, u nichž byl progresivní pohyb zjišťován na konci termorezistentního testu u 20 % a 10 % spermií. Statisticky významný ($p_{0,05}$) je i rozdíl v plodnosti dosahované ejakuláty s 30% aktivitou spermií a 0% aktivitou spermií, zjišťovanou na konci termorezistentního testu. Nulové zjištění progresivního pohybu spermií v průběhu dvouhodinového termorezistentního testu zcela jasně poukazuje na nevyrovnané funkční vlastnosti ejakulátů, které jsou i podle ČSN 46 7111 použitelné k inseminaci. Z výsledků našich pokusů zcela jasně vyplývá, že vyřazení ejakulátů s nejhorší či žádnou pohyblivostí spermií na konci termorezistentního testu by nutně zvyšovalo průměrné procento zabřezávání, protože kategorie plemenic osemeňovaných tímto semenem měla o více než 5 % nižší zabřezávání po první inseminaci.

Procento březosti po první inseminaci je ovlivňováno mnoha faktory. Za nejčastější příčinu kolísavé a menší plodnosti se považuje různá úroveň práce inseminační technika, nestejná organizace procesu reprodukce a péče o zvířata v zemědělských závodech, různá užitkovost a zdravotní stav plemenic, včetně skutečnosti, že není využíváno jen optimální doby k inseminaci (Vinkler, 1980; Brahmstaedt a Schönmuht, 1983 a jiní).

Vycházíme-li ze skutečnosti, že organizaci inseminace v zemědělských závodech ani péči o plemence nelze jednoduchým způsobem změ-

nit, pak určité procento plemenic je inseminováno v nepříliš vhodné době říje. Nejčastěji se jedná o inseminaci v první polovině říje, a to bez ohledu na působení dalších faktorů, které ovlivňují vitalitu spermií i v pohlavních orgánech plemenic. Použije-li se v tomto případě k inseminaci semene s delší přežitelností dostatečného počtu spermií v inseminační dávce, je pravděpodobné, že dojde k oplození „později“ sestupujícího vajíčka ve více případech, než při použití spermatu s nižší přežitelností spermií. Termorezistentním testem se však prověřují i funkční vlastnosti spermií. Tyto vlastnosti jsou nezbytné při pasáži cestami pohlavních orgánů plemenic, které vždy nepředstavují optimální prostředí pro přežití spermií do té doby, než projdou do míst, ve kterých dochází k procesu oplození.

Z výsledků našeho pozorování vyplývá, že dvouhodinový termorezistentní test (38 °C) je snadno proveditelnou zkouškou, která vhodně doplňuje dosavadní jednorázové hodnocení aktivity spermií býka po rozmrazení semene. Na základě srovnání našich výsledků s výsledky, které udávají Vinkler (1980) a Larsson a Darenius (1980), je možné vyslovit názor, že doba přežitelnosti spermií po rozmrazení by měla být limitující pro jejich použitelnost k inseminaci.

Objektivnější posuzování funkčních vlastností spermií pomocí termorezistentního testu, a tím i přísnější výběr ejakulátů býků po rozmrazení semene (vyřazení ejakulátů s nulovou a 10% aktivitou spermií na konci termorezistentního testu), by na základě našeho pozorování vedly k zvýšení březosti po první inseminaci asi o pět i více procent. Snaha zlepšovat výsledky na úseku reprodukce však nemůže být chápána jen tak, že se budou zdokonalovat technologické postupy při zpracování a posuzování semene, ale musí být založena i na zlepšené práci pracovníků zemědělských závodů.

Literatura

- BABUŠÍK, P.: Penetračná schopnosť kryokonzervovaných kančích spermií. In: Kryokonzervácia pohlavných buniek a včasných embryí. Bratslava, 1983, s. 118-120.
- BRAHMSTAEDT, U. — SCHÖNMUTH, G.: Der Einfluss von Betrieb, Besamungstechniken und Rastzeit auf die Fruchtbarkeit in den Rinderbeständen. Tierzucht, 37, 1983, č. 1, s. 12-14.
- ČSN 46 7111. Sperma býka. 1977.
- JONDET, R. — FILHO, A. M. — RABADEUX, Y.: L'épreuve de thermorésistance dans l'appréciation de la valeur du sperm bovin congelé. C. R. Séanc. Soc. Biol., 172, 1978, č. 4, s. 764.
- KOZUMPLÍK, J.: Délka přežitelnosti spermií kance po rozmrazení. In: Sbor. IV. Příbylový dny, 1977, s. 96-98.
- LARSSON, K. — DARENIUS, K.: The fertility of A. I. boars in relation to sperm viability after dilution and storage. Int. Pig veter. Soc., Congr., Copenhagen, 1980, s. 32.
- LINFORD, E. — GLOVER, F. A. — BISHOP, C. — STEWARD, D. C.: The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. J. Reprod. Fertil., 47, 1976, s. 283-291.
- MAJERČIAK, P. — PAVLOK, A. — BABUŠÍK, P.: Hodnotenie fertilizačnej kapacity čerstvého kančieho ejakulátu testom penetrácie spermií do vajíčok chrčka sýrskeho zbavených zony pellucidy. Živoč. Vyr., 27, 1982, č. 8, s. 627-639.
- MUDRA, K. — UECKERT, H. — EBERTUS, R. et al.: Die Beurteilung der Fruchtbarkeit von Bullen für die künstliche Besamung. Tierzucht, 29, 1975, č. 9, s. 401-404.

PETELÍKOVÁ, J. — ČECHOVÁ, D. — PAVLOK, A.: Zdokonalení metod hodnocení konzervační schopnosti ředidel kančího i beraního spermatu *in vitro*. In: Kryo-konzervácia pohlavných buniek a včasných embryí. Bratislava, 1983, s. 121-129.

SMUTNÁ, M.: Hodnocení ejakulátu sledováním lipoperoxidace. [Dílčí úkol — výzkumná zpráva.] Brno, Vysoká škola veterinární 1980. 38 s.

SOSNOVÁ, J.: Vztah vybraných ukazatelů kvality ejakulátů býků k dosahované plodnosti. [Atestační práce.] Brno, Vysoká škola veterinární 1984. 42 s.

ŠRÁMEK, Č.: Změna obsahu proakrozinu a akrozinu během konzervace semene berana. [Kandidátská disertační práce.] Brno 1981. 81 s. — Vysoká škola veterinární.

ŠRÁMEK, Č. — ČECHOVÁ, D. — ŽELEZNÁ, B. — KOZUMPLÍK, J. — PETELÍKOVÁ, J.: Změna obsahu proakrozinu během konzervace semene berana. Veter. Med. (Praha), 30, 1985, č. 4, s. 231-237.

TGL 22261-82. Rinderproduktion. Aufbereitung, Lagerung und Transport von gefrierkonserviertem Bullensperma.

VEŽNÍK, Z. — HRUŠKA, K.: Posuzování kvality ejakulátů z hlediska funkční potenciality. Náš Chov, 17, 1974, č. 1, s. 82-83.

VINKLER, A.: Hodnocení kvality mraženého ejakulátu býků pomocí vybraných ukazatelů a vliv některých faktorů na dosahovanou plodnost. [Kandidátská disertační práce.] Brno 1980. 168 s. — Vysoká škola veterinární.

Došlo dne 30. 10. 1984

КОЗУМПЛИК, Я. — СОСНОВА, Я. (Институт ветеринарии, Брно; Районное ветеринарное управление, Пильзень): Терморезистентный тест спермиев и плодовитость быков. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 385-392.

Прослеживали спермиограмму 17 быков, у 160 эякулятов определяли выживаемость спермиев после размораживания с помощью терморезистентного теста (38 °C). После I осеменения 10 782 коров отмечены статистически значимые различия между оплодотворяющей способностью эякулятов с разной величиной теста. Эта способность лучше у эякулятов, где прогрессивное движение сохраняется в течение 2 час. теста у 40 % спермиев. Из 1496 осемененных коров зачала 971, т. е. 64,9 %, тогда как при осеменении 4216 коров семенем с прогрессивным движением, установленным у 30 % спермиев в конце теста, зачали 2403 коровы, т. е. 56,98 %, а это значимая статистическая разница ($p_{0.05}$). С понижением активности спермиев плодовитость после I осеменения еще ниже. Хотя есть определенная разница в индивидуальной плодовитости производителей (54 и 67 %), между результатами теста и реальной плодовитостью отношение положительное у всех производителей.

бык; замороженное семя; выживаемость спермиев; оплодотворяющая способность

KOZUMPLÍK, J. — SOSNOVÁ, J. (University of Veterinary Medicine, Brno; District Veterinary Station, Plzeň): *The Thermoresistance Test of Spermatozoa and the Fertility of Bulls*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 385-392.

The spermograms of 17 bulls were studied and 160 ejaculates were subjected to the thermoresistance test (38 °C) to evaluate sperm survival after thawing. After the first insemination of 10 682 cows, statistically significant differences were found in the fertilizing capacity of the ejaculates with various values of the thermoresistance test. The best sperm fertilizing capacity was obtained in the ejaculates which retained progressive movement in 40 % of the spermatozoa after two hours of exposure to the thermoresistance test. Out of the 1496 cows inseminated, 971 (i. e. 64.9 %) got in calf, whereas after the insemination of 4216 cows with semen where only 30 % of spermatozoa moved progressively at the end of the test, the number of pregnant dams was 2403, i. e. 56.98 %; this difference is statistically significant ($p_{0.05}$). At a lower sperm activity in the test the fertility after the first insemination was even lower. Although there was some difference in the individual fertility of bulls (54 to 67 %), a positive relationship between the results of the thermoresistance test and fertility was recorded in all bulls.

bull; frozen semen; sperm survival; fertilizing capacity

Adresa autorů:

Prof. MVDr. Jaroslav Kozumplík, CSc., MVDr. Jana Sosnová, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

M. Toman, I. Pšíkal

TOMAN, M. — PŠIKAL, I. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Test fagocytární aktivity krevních leukocytů telat*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 393-400.

Metodu fagocytózy 2-hydroxyetylmetakrylátových částic (HEMA) v celé krvi jsme upravili pro hodnocení fagocytární aktivity leukocytů telat. Na základě srovnání výsledků několika variant testu jsme stanovili nejvhodnější postup, pro který platí zásady: dodržení maximální koncentrace 10 m. j. heparinu v 1 ml krve, zpracování čerstvých vzorků, inkubace 0,5 až 1 hodinu při teplotě 37 °C, důkladné roztřepání po skončené inkubaci s případným přidáním EDTA. Navrženým postupem jsme vyšetřili fagocytární aktivitu devíti 2,5 až 3 měsíce starých telat. Zjistili jsme 18,6 % fagocytujících leukocytů s indexem fagocytární aktivity 7,07.

fagocytóza; krev; tele

Fagocytóza se z původní funkce potravy u prvků stala v průběhu fylogenetického vývoje důležitým mechanismem nespecifické obrany vyšších živočichů. Jejím úkolem je vychytávat a destruovat cizorodé antigeny, nebo je předávat dalším regulačním strukturám imunitního systému. Od první práce uveřejněné Mečnikovem (1892), který popsal funkci fagocytů v obraně organismu, je fagocytóza stále předmětem zájmu mikrobiologů a imunologů a sporadicky našla uplatnění i ve veterinární medicíně (Menšík a Černý 1954).

Intenzita fagocytózy je hodnocena různými metodami, které k in-gesci využívají bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., kvasinek *Candida albicans* (Guidry aj., 1974; Paape a Pearson, 1979; Roth a Kaerberle, 1980, 1981) nebo intaktních latexových nebo kadmiových částic (Palisa, 1978; Bjerknes a Bassøe, 1983). V některých metodách je fagocytární aktivita (FA) měřena nepřímou metabolickými testy (Lombardo aj., 1979; Roth a Kaerberle, 1980) nebo radiologickou technikou (Neumann aj., 1984). Fagocytóza je sledována buď v krvi, nebo jsou separačními metodami připravovány suspenze buněk z krve nebo lymfoidních orgánů.

Cílem naší práce bylo získat jednoduchou, rychlou a v praxi snadno použitelnou metodu pro hodnocení nespecifické obranyschopnosti mláďat hospodářských zvířat. K tomu účelu jsme využili metody fagocytózy intaktních částic polymeru 2-hydroxyetylmetakrylátu, vyvinuté v Ústavu makromolekulární chemie a v Mikrobiologickém ústavu ČSAV (Větička aj., 1982).

MATERIÁL A METODY

ZVÍŘATA A ODBĚR VZORKŮ

V testu FA jsme použili zdravá telata ve věku od sedmi dnů do tří měsíců. Jednotlivé varianty jsme ověřovali v krvi trojice zvířat z jednoho odběru. Krev jsme odebírali do plastických jednorázových stříkaček tak, aby výsledná koncentrace heparinu nepřekročila 10 m. j. (10 m. j. v 0,2 ml PBS + 0,8 ml krve).

TEST FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITY — ZÁKLADNÍ POSTUP (Větráček aj., 1982)

Vzorky krve jsme zpracovali do 15 minut po odběru. Do plastické zkumavky (typ Eppendorf 1,5 ml Hardmuth, provoz Dalečín) jsme napipetovali 0,05 ml partikulí, ředěných v PBS na koncentraci $4-5 \times 10^8/\text{ml}$. Přidali jsme 0,1 ml krve, řádně rozmíchali a inkubovali jednu hodinu při teplotě 37°C za občasných protřepávání. V terénních podmínkách jsme k inkubaci použili temperovanou vodní lázeň v širokohrdlé termosce. Po skončení inkubace jsme vzorky znovu důkladně promíchali, zhotovili krevní nátěry a ty jsme obarvili standardní panoptickou metodou MAY-GRÜNWARD-GIEMSA podle PAPPENHEIMA (Wolf, 1954).

VARIANTA I (ČAS OD ODBĚRU PO DOBU ZPRACOVÁNÍ)

Mezi dobou odběru a zpracováním jsme krev nechali stát a) dvě hodiny při pokojové teplotě, b) dvě hodiny v termostatu.

VARIANTA II (POMĚR KRVE A PARTIKULÍ)

a) Krev jsme smíchali s částicemi v poměru 1 : 1 (0,1 ml krve a 0,1 ml částic). Použili jsme dvojnásobné koncentrace částic a smísili jsme 0,05 ml částic s 0,2 ml krve (poměr krve a částic zůstal zachován).

VARIANTA III (DOBA INKUBACE)

Proti základnímu postupu jsme vzorky krve inkubovali 0,5 hodiny.

VARIANTA IV (PŘIDÁNÍ EDTA)

Aby se snížilo shlukování fagocytujících buněk, přidali jsme pět minut před koncem inkubace ke vzorkům 0,05 ml roztoku Na_2EDTA (Chelaton III, Lachema Brno) v koncentraci 100 mg/ml PBS.

VÝPOČET FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITY

Stanovili jsme diferenciální počet nejméně sta bílých krvinek a v nich jsme sledovali počet pohlcených partikulí. Pro vyhodnocení FA jsme srovnávali krevní obraz s procentem fagocytujících buněk a vypočítali index FA jako průměrný počet pohlcených částic na každou potenciálně fagocytující buňku.

$$\text{index FA} = \frac{\text{suma částic pohlcených buňkami}}{\text{počet potenciálních fagocytů}}$$

1. Neutrofilní granulocyt s 25 pohlcenými částicemi (May Grünwald-Giemsa) — Neutrophile granulocyte with 25 engulfed particles (May Grünwald-Giemsa)



VÝSLEDKY

V testu FA fagocytovaly výhradně neutrofilní granulocyty a monocyty. Intenzívně modrofialově zbarvené metakrylátové částice jsme nacházeli v cytoplasmě fagocytujících buněk i volně roztroušené mimo buňky (obr. 1, 2). Hodnoty FA vykazovaly, stejně jako krevní obrazy, značné individuální rozdíly, blížily se však sobě u zvířat stejného věku. I u jednotlivých buněk v jednom preparátu jsme pozorovali značné rozdíly, a to od žádné nebo jedné pohlcené částice až po 35 až 40 pohlcených částic.

Prodloužení času mezi odběrem a zpracováním vzorků (varianta I) mělo negativní vliv na hodnoty FA (tab. I). U všech tří testovaných telat byly nejlepší výsledky s krví zpracovávanou do 15 minut po odběru. Zatímco v takto zpracované krvi fagocytovalo průměrně 80,7 % neutrofilů a monocytů s indexem FA 5,97, po dvouhodinovém uložení vzorku do termostatu se procento snížilo na 73,3 a index FA na 3,36.

2. Fagocytující buňky — neutrofilní granulocyt a monocyty (May Grünwald-Giemsa) — Phagocytic cells — neutrophile granulocyte and monocyte (May Grünwald-Giemsa)



I. Vliv prodloužení intervalu mezi odběrem a zpracováním vzorků na fagocytární aktivitu leukocytů (varianta I) — The effect of the prolongation of the interval between sample taking and processing on the phagocytic activity of leucocytes (variant I)

Zpracování	Procento neutrofilů a monocytů	Procento fagocytujících leukocytů	Procento fagocytujících fagocytů	Index FA
Do 15 minut	28,5	25,0	80,7	5,97
Po dvou hodinách při teplotě 20 °C	29,5	18,5	62,7	2,32
Po dvou hodinách při teplotě 37 °C	30,0	22,0	73,3	3,36

Po dvou hodinách stání při laboratorní teplotě klesla fagocytóza dokonce na 62,7 % a index FA na 2,32. Došlo tedy k útlumu fagocytózy o 25 až 50 %.

Při změnách poměru krve a partikulí jsme nezjistili významné rozdíly FA. Poměr 0,2 ml krve a 0,05 ml partikulí v dvojnásobné koncentraci je však výhodný, protože krev je nejméně zředována, což usnadňuje odečítání buněk v nátěrech.

V pokusu podle varianty III jsme získali vyšší hodnoty při hodinové inkubaci. Rozdíly však nejsou významné. Zatímco při hodinové inkubaci fagocytovalo průměrně 80,7 % neutrofilů a monocytů s indexem FA 5,97, po půlhodinové inkubaci fagocytovalo 76,8 % buněk s indexem FA 5,60.

Chelaton přidáný ke vzorkům na konci inkubace (varianta IV) podstatně zlepšuje podmínky pro prohlížení preparátů. Neutrofilní granulocyty a monocyty se při této modifikaci vyskytovaly po celé ploše sklíčka, aniž by tvořily shluky. Přestože se nejednalo o skutečné zvýšení FA, napočítali jsme po přidání chelatonu vyšší procentuální zastoupení neutrofilů a monocytů a také procento fagocytujících buněk bylo vyšší. Index FA se však výrazně nezměnil (tab. II).

Abychom získali orientační hodnoty FA, vyšetřili jsme základním postupem devět klinicky zdravých telat ve věku 2,5 až 3 měsíce (tab. III). V tomto věku obsahovala krev telat průměrně 27,5 % potenciálních

II. Vliv přidání chelatonu III (EDTA) na hodnoty krevního obrazu a fagocytární aktivity leukocytů (varianta IV) — The effect of the addition of chelatorne III (EDTA) on the values of blood picture and phagocytic activity of leucocytes (variant IV)

Vzorky	Procento neutrofilů a monocytů	Procento fagocytujících leukocytů	Procento fagocytujících fagocytů	Index FA
Bez EDTA	14,0	9,7	69,3	4,55
S EDTA	25,0	19,3	77,2	4,51

III. Diferenciální krevní obraz a hodnoty fagocytární aktivity u 2,5 až 3 měsíce starých telat — The differential blood picture and the values of phagocytic activity in 2.5 to 3 months old calves

Číslo tele	Procento bílých krvinek					Leukocyty		Neutrofil		Monocyty	
	tyčky	segment	monocyty	lymfocyty	eozinofily	procenta fagocytujících leukocytů	index FA	procenta fagocytujících neutrofilů	index FA	procenta fagocytujících monocytů	index FA
410	5	42	1	51	1	34	12,88	72,3	13,15	0	0
412	2	19	8	70	1	15	7,31	66,7	10,05	12,5	0,13
311	2	20	6	67	5	15	3,04	50,0	3,45	66,7	1,50
315	0	23	6	67	4	14	4,10	56,5	5,04	16,7	0,50
707	1	14	11	74	0	23	11,84	90,3	18,67	81,8	2,36
26	2	19	13	66	0	26	4,47	66,7	5,24	92,3	3,23
25	3	6	5	86	0	14	4,29	44,4	6,33	40,0	0,60
226	2	11	5	82	0	11	6,83	69,2	8,07	40,0	3,60
727	1	9	12	78	0	15	8,86	80,0	17,20	58,3	1,91
Průměr	2,0	18,1	7,4	71,2	1,2	18,6	7,07	66,2	9,69	45,4	1,54
	0,5	3,5	1,3	3,5	0,6	2,5	1,18	4,8	1,84	10,7	0,44

fagocytů, tj. neutrofilních granulocytů a monocytů. Z tohoto množství fagocytovalo 60,9 % buněk, což je 18,6 % všech krevních leukocytů. Průměrný index FA byl 7,07. Při intervalu spolehlivosti pro $\alpha = 0,05$ se pro danou populaci pohybují střední hodnoty od 12,5 do 24,5 fagocytujících buněk s indexem aktivity 4,5 až 10.

DISKUSE

Z výsledků jednotlivých variant testu se jako optimální projevuje základní postup při použití 0,05 ml partikulí koncentrace $8 - 10 \times 10^8 / \text{ml} \times 0,2 \text{ ml}$ krve (varianta IIb) a při přidání EDTA před koncem inkubace (varianta IV). Vzhledem k minimálním rozdílům při půlhodinové a hodinové inkubaci lze doporučit i kratší dobu inkubace; tato doba však samozřejmě musí být dodržena pro všechna vyšetření. Za zásadní podmínky pro správný průběh fagocytózy považujeme dodržení maximální koncentrace 10 m. j. heparinu v krvi, zpracování čerstvé krve, inkubaci při teplotě 37°C a důkladné roztřepání vzorku po skončené inkubaci. Tyto podmínky odpovídají postupu původní metody (Větvíčková aj., 1982). Vzhledem k častému shlukování fagocytujících buněk při okraji nátěru telecí krve doporučujeme před koncem inkubace rozvolnit buňky chelatonem. Tento postup byl využit již dříve (Guidry aj., 1974). Tito autoři doporučují před vlastním provedením testu předinkubaci tři hodiny v termostatu. Tento postup

se nám však zásadně neosvědčil a znamenal téměř vždy výrazný pokles fagocytózy.

Proti původní metodě (Větvíčka aj., 1982) jsme upravili způsob vyhodnocení výsledků. Nepočítáme fagocytující buňky od tří pohlcených částic výše, ale za fagocytující považujeme každou buňku, která pohltila alespoň jednu částici. Počítáme však index FA jako průměrný počet pohlcených částic na jednu potenciálně fagocytující buňku.

Při hodnocení FA je nutné vzít v úvahu hodnoty bílého krevního obrazu. Změny počtu leukocytů i změny poměru jednotlivých druhů leukocytů ovlivňují hodnoty FA a je třeba rozhodnout, zda se jedná o skutečnou změnu FA nebo ne. Při hodnocení FA krve jedince posuzujeme komplexně hodnoty bílého krevního obrazu, procento fagocytujících buněk a index FA. Tyto hodnoty srovnáváme s průměrem populace, přičemž za zvýšenou fagocytární aktivitu považujeme krev, ve které je při normálním rozložení bílé řady procento fagocytujících buněk i index FA nad středními hodnotami.

Získané hodnoty FA tříměsíčních telat odpovídají hodnotám udávaným jinými autory. Větvíčka aj. (1982) zjistili 20,1 % fagocytujících leukocytů u dětí a 34,4 % u zdravých dospělých dárců. Salwa (1982) použil k fagocytóze *E. coli* inaktivované formalinem. Zjišťoval 17 až 23 % fagocytujících leukocytů periferní krve telat v závislosti na věku zvířat. Roth a Kaeblerle (1980) použili *Staphylococcus aureus* ke sledování FA neutrofilních granulocytů telat. V dané populaci zjistili 52,0 % fagocytujících buněk.

Metodu fagocytózy 2-hydroxyethylmetakrylátových částic považujeme za vhodnou metodu pro sledování nespecifické buněčné obrany hospodářských zvířat. Chceme jí v další práci využít jako součásti komplexního vyšetření imunologického profilu jedince nebo stáda při infekčních chorobách, při sledování vlivu vakcinace na imunitní systém apod. Její modifikace lze využít pro studie ontogeneze imunitního systému, vztahu matka—mládě, nebo k detailnímu sledování jednotlivých složek fagocytárního systému (Fornůsek aj., 1983).

Poděkování

Autoři děkují MUDr. M. Holubovi za poskytnutí 2-hydroxyethylmetakrylátových částic.

Literatura

- BJERKNES, R. — BASSØE, C. F.: Human leucocyte phagocytosis of zymosan particles measured by flow cytometry. *Acta path. microbiol. immunol. scand., Sect. C*, 91, 1983, s. 341.
- FORNŮSEK, L. — KOPEČEK, J. — VĚTVÍČKA, V.: An advantageous method for detection of Fc-receptors and for studying Fc-receptor-mediated phagocytosis. *Immun. Lett.*, 7, 1983, s. 29-33.
- GUIDRY, A. J. — PAAPE, M. J. — MILLER, R. H.: *In vitro* procedure for measuring phagocytosis of blood neutrophils. *Amer. J. veter. Res.*, 35, 1974, s. 705-709.
- LOMBARDO, P. S. — EBERHARDT, R. J. — TODHUNTER, D. A.: Effect of colostrum ingestion on indices of neutrophil phagocytosis and metabolism in newborn calves. *Amer. J. veter. Res.*, 40, 1979, s. 362-368.
- MENŠÍK, J. — ČERNÝ, L.: Opsonofagocytární index v diagnostice brucellosy skotu a prasat. In: Sbor. Českoslov. Akad. zeměd. Věd, XXVII, 1954, s. 639-657.

- MENŠÍK, J. — ČERNÝ, L.: Opsonofagický test v diagnostice brucellosy. In: Sbor. Českoslov. Akad. zeměd. Věd, XXVII, 1954, s. 657-672.
- METCHNIKOFF, I.: Patologie comparée de l'inflammation. Masson Paris, 1982. In: MEČNIKOV, I.: Srovnávací patologie zánětu. Praha, Stát. zdravot. nakl. 1952.
- NEUMANN, R. — MEHLHORN, G. — BIER, H. — BOSCHET, Chr.: Die Messung der Fagozytoseaktivität im Blut von Schweinen mittels Radioreagenztechnik. Arch. exp. Veter.-Med., 38, 1984, s. 21-36.
- PALISA, V.: The *in vitro* method for measurement of phagocytosis. Imunol. Zprav., 9, 1978, s. 42.
- PAAPE, M. J. — PEARSON, R. E.: Sources of variation in *in vitro* phagocytosis assays. Amer. J. veter. Res., 40, 1979, s. 630-635.
- ROTH, J. A. — KAEBERLE, M. L.: Isolation of neutrophils and eosinophils from the peripheral blood of cattle and comparison of their functional activities. J. immunol. Meth., 45, 1980, s. 153-164.
- ROTH, J. A. — KAEBERLE, M. L.: Evaluation of bovine polymorphonuclear leucocyte function. Veter. Immunol. Immunopath., 2, 1981, s. 157-174.
- SALWA, A.: Wstępne badania nad czynnością fagocytarną granulocytów obojętnych we krwi cieląt noworodków. Med. weter., XXXVIII, 1982, s. 582-584.
- VĚTVIČKA, V. — FORNŮSEK, L. — KOPEČEK, J.: Phagocytosis of human blood leucocytes: a simple micromethod. Immun. Lett., 5, 1982, s. 97-100.
- WOLF, J.: Mikroskopická technika. Praha, SZN 1954. 656 s.

Došlo dne 12. 10. 1984

TOMAN, M. — ПШИКАЛ, И. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно). Тест фагоцитарной активности кровяных лейкоцитов телят. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 393-400.

Метод фагоцитоза 2-гидроксиэтилметакрилатовых частиц (HEMA) во всей крови приспособили к оцениванию фагоцитарной активности лейкоцитов телят. На основе сравнения нескольких вариантов теста определяли самый подходящий способ с соблюдением следующих правил: макс. концентрация 10 м. ед. гепарина/мл крови, образцы обрабатывать в свежем виде, инкубировать 0,5—1 час при 37 °C, тщательно встряхивать после инкубации с возможной добавкой EDTA. Таким способом исследовали фагоцитарную активность 9 телят в возрасте 2,5—в мес. Установили 18,6 % фагоцитирующих лейкоцитов с индексом активности 7,07 фагоцитоз; кровь; теленок

TOMAN, M. — PŠIKAL, I. (Veterinary Research Institute, Brno): *The Phagocytic Activity Test in the Blood Leucocytes of Calves*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 393-400.

The 2-hydroxyethylmetacrylate-particle (HEMA) phagocytosis method in whole blood was adapted to the evaluation of the phagocytic activity of the leucocytes of calves. Several test variants were compared and the best procedure was determined, based on the following principles: keeping the heparin concentration at 10 i. u. in 1 ml of blood at the maximum, using fresh samples, incubating at 37 °C for 0.5 to 1 hour, thoroughly agitating the sample after incubation, with possible addition of EDTA. The phagocytic activity of nine calves, 2.5 to 3 months old, was examined by the proposed procedure and 18.6 % phagocytic leucocytes were found, the phagocytic index being 7.07.

phagocytosis; blood; calf

TOMAN, M. — PŠIKAL, I. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Test der phagozytären Aktivität von Blutleukozyten der Kälber*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 393-400.

Die Methode der Phagozytose der 2-Hydroxyäthylmethakrylatkorpuskeln (HEMA) im Gesamtblut haben wir zur Bewertung der phagozytären Aktivität der Leuko-

zyten bei Kälbern modifiziert. Aufgrund eines Vergleichs von Ergebnissen mehrerer Varianten des Testes bestimmten wir das vorteilhafteste Verfahren, für das folgende Grundsätze gelten: Einhalten der Maximalkonzentration von 10 i. E. Heparin in 1 ml Blut, Verarbeitung frischer Proben, Inkubation 0,5 bis 1 Stunde bei einer Temperatur von 37 °C, gründliche Verteilung nach beendeter Inkubation, mit eventueller Beigabe von EDTA. Mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens untersuchten wir die phagozytäre Aktivität von neun, 2,5 bis 3 Monate alten Kälbern. Wir stellten 18,6 % phagozytischer Leukozyten fest, mit einem Index der phagozytären Aktivität von 7,07.

Phagozytose; Blut; Kalb

Adresa autorů:

MVDr. Miroslav Toman, MVDr. Ivan Pšíkal, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

FAGOCYTÁRNÍ AKTIVITA KREVNÍCH LEUKOCYTŮ TELAT OD NAROZENÍ DO VĚKU TŘI MĚSÍCE

M. Toman, I. Pšikal, J. Menšík

TOMAN, M. — PŠIKAL, I. — MENŠÍK, J. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Fagocytární aktivita krevních leukocytů od narození do věku tři měsíce*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 401-408.

Testem fagocytózy 2-hydroxyethylmetakrylátových (HEMA) částic jsme vyšetřili 43 telata různého věku od nultého dne do tří měsíců. Nalezli jsme signifikantní rozdíly fagocytární aktivity krevních leukocytů v závislosti na věku. U novorozených telat byla fagocytární aktivita velmi nízká, fagocytovalo jen 16,5 % leukocytů s indexem fagocytární aktivity 0,39. V dalších dnech aktivita výrazně stoupala. Ve věku tři dny fagocytovalo 43 % leukocytů telat. Šestý až sedmý den jsme zaznamenali pokles aktivity a teprve od tří týdnů až jednoho měsíce věku měla fagocytární aktivita opět vzestupnou tendenci. U bezkolostrálních telat jsme tuto dynamiku fagocytární aktivity nezaznamenali. Nízké hodnoty přetrvávaly delší dobu po narození bez typického zvýšení třetí až pátý den. Fagocytární aktivita se zvyšovala u bezkolostrálních zvířat experimentálně infikovaných rotavirem.

fagocytóza; krev; kolostrum; tele; ontogeneze imunity

Tele se rodí agamaglobulinemické bez specifické humorální a buněčné imunity. Imunitní systém je ve stadiu dozrávání, mnohé z jeho funkcí, jako je aktivita komplementu nebo odpověď lymfocytů na mitogeny, jsou dosud sníženy (Banks, 1982). Od prvních hodin po narození se jedinec setkává s ohromným množstvím antigenů, které pomáhají imunitní systém dotvářet, ale hrozí i napadením organismu. Hlavním prostředkem ochrany v tomto období je kolostrum matky s množstvím protilátek a s možností přestupu přes stěnu střevní do krevního řečiště. Současně se již začínají uplatňovat vlastní obranné reakce telete (Welliver a Ogra, 1978; Opdebeeck, 1982; Banks, 1982).

Jedním z velmi důležitých článků komplexu obranných mechanismů je fagocytóza. Je klíčovým bodem zánětlivé reakce a zároveň spojovacím článkem mezi nespecifickou a specifickou imunitou, mezi imunitní odpovědí humorální a buněčnou. Má možnost destruovat cizorodé antigeny, ale také je prezentovat T lymfocytům a dalším strukturám imunitního systému a znovu s nimi reagovat po navázání komplementu nebo protilátky. Funkční stav fagocytujících buněk, v krvi zastoupených populací neutrofilních granulocytů a monocytů, je tedy jedním z ukazatelů celkové imunokompetence organismu.

O fagocytární aktivitě novorozených telat bylo doposud málo poznatků. V poslední době se v literatuře objevily údaje o fagocytární aktivitě krevních leukocytů novorozených telat ve vztahu k věku (Salwa,

1982), k účinku kolostra (La Motte a Eberhart, 1976; Lombardo aj., 1979) či poklesu kortikosteroidů po porodu (La Motte a Eberhart, 1976). Cílem naší práce bylo zjistit hodnoty fagocytární aktivity u telat různého věku a sledovat vliv kolostra na její rozvoj.

MATERIÁL A METODY

ZVÍRATA A ODBĚR VZORKŮ

V prvním pokuse jsme vyšetřili 43 telata plemene černostrakatý nížinný skot různého věku od prvního dne po narození do tří měsíců. Telata byla odchovávána v teletníku s minimální nemocností, v prvních dnech byla napájena kolostrem a od třetího dne Laktosanem. Ve druhém pokuse jsme sledovali fagocytární aktivitu u bezkolostrálně odchovávaných zvířat. Hned po narození byla telata odstavena od matky, osušena a bylo jim i. p. aplikováno 100 ml hovězího IgM, izolovaného od zdravých krav. Vyživována byla mléčnou dietou, podle potřeby s přidavkem čaje. Dvě telata jsme infikovali třetí den orgánovým rotavirem *per os*.

Krev jsme odebírali do plastických jednorázových stříkaček s heparinem tak, aby výsledná koncentrace heparinu nepřekročila 10 ml.

TEST FAGOCYTÓZY

Použili jsme modifikovanou metodu fagocytózy 2-hydroxymetakrylátových částic podle Větvíčky aj. (1982), podrobně popsanou v předchozím sdělení (Toman a Pšíkal, 1985). Suspenzi 0,05 ml partikulí ředěných v PBS ($8-10 \times 10^8$ /ml) jsme inkubovali s 0,2 ml čerstvě odebrané krve v plastických zkumavkách jednu hodinu při teplotě 37 °C. Pět minut před ukončením inkubace jsme ke vzorku přidali 0,05 ml roztoku Na₂EDTA (100 mg/ml). Po skončení inkubace jsme vzorky důkladně rozmíchali, zhotovili krevní nátěry a barvili je panoptickým barvením MAY-GRÜNWALD GIEMSOU.

Stanovili jsme diferenciální rozpočet bílých krvinek a v nich jsme sledovali počet pohlcených částic. Pro vyhodnocení fagocytární aktivity jsme srovnávali krevní obraz s procentem fagocytujících buněk a vypočítali index fagocytární aktivity jako průměrný počet pohlcených částic na jednu potenciálně fagocytující buňku.

V každé věkové kategorii jsme vypočítali aritmetický průměr získaných hodnot a střední chybu průměru. Hodnoty jednotlivých skupin zvířat jsme porovnávali Studentovým *T* testem.

VÝSLEDKY

V testu fagocytovaly výhradně neutrofilní granulocyty a monocyty. Jednotlivé fagocytující buňky obsahovaly různý počet partikulí od 1 do 40.

V prvním pokuse jsme sledovali dynamiku fagocytární aktivity (FA) u telat různého věku. Tab. I ukazuje hodnoty leukogramu. Krev novorozených telat obsahovala vysoké procento neutrofilních granulocytů, a to jak tyček, tak segmentů. Jejich obsah v závislosti s věkem klesal, obsah lymfocytů naopak stoupal. Rozdíly těchto hodnot mezi telaty do tří týdnů věku a tříměsíčními telaty jsou vysoce signifikantní. Procento monocytů a eozinofilů kolísalo nepravidelně a jejich rozdíly byly u jednotlivých kategorií zvířat nevýznamné.

Hodnoty fagocytární aktivity jsou shrnuty v tab. II a dynamika je naznačena v obr. 1. FA krve novorozených telat (těsně po napití ko-

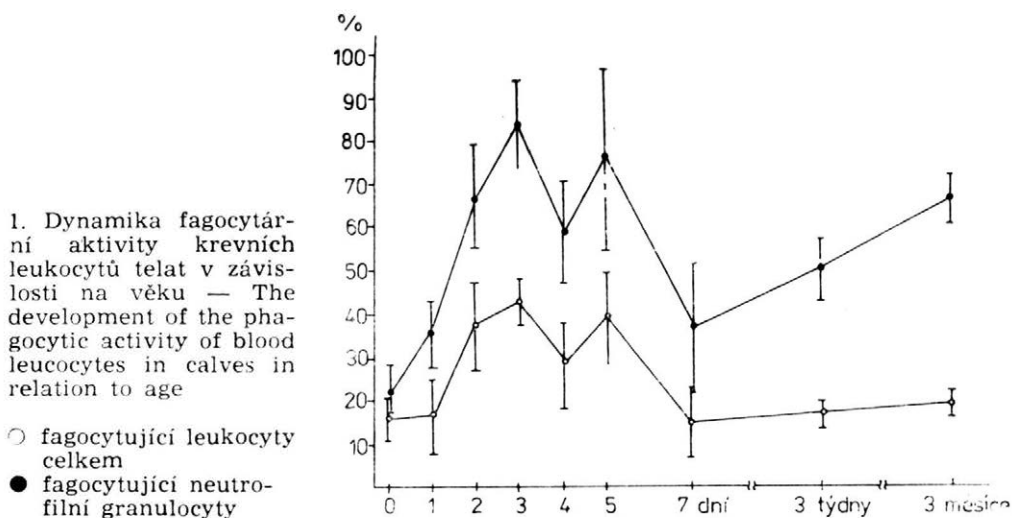
I. Krevní obraz telat ve věku 0 dnů až tři měsíce — The blood picture of calves at the age from 0 days to 3 months

Věk telat (počet)	Procentuální zastoupení buněk				
	tyčka*)	segment	monocyt	lymfocyt	eozinofil
0 dní (2)	6,0 (± 0,0)	67,5 (± 2,5)	2,0 (± 1,0)	24,0 (± 4,0)	0,5 (± 0,5)
1 den (4)	3,5 (± 0,2)	37,5 (± 13,3)	3,5 (± 0,9)	52,3 (± 14,6)	3,0 (± 1,3)
2 dny (5)	4,8 (± 1,5)	48,8 (± 8,6)	7,4 (± 3,3)	37,2 (± 9,6)	1,8 (± 0,8)
3 dny (4)	3,8 (± 2,1)	39,8 (± 8,5)	12,0 (± 3,7)	44,3 (± 9,0)	0,3 (± 0,3)
4 dny (5)	8,2 (± 3,2)	30,4 (± 5,7)	11,0 (± 5,1)	50,0 (± 9,0)	0,4 (± 0,4)
5 dní (2)	5,5 (± 1,5)	36,5 (± 3,5)	9,5 (± 3,5)	47,5 (± 0,5)	1,0 (± 1,0)
6–7 dní (3)	2,6 (± 1,2)	34,7 (± 7,4)	5,3 (± 1,5)	57,3 (± 8,9)	0,0 (± 0,0)
3 týdny (9)	2,3 (± 0,5)	26,0 (± 4,1)	5,3 (± 0,9)	66,2 (± 4,2)	0,1 (± 0,1)
3 měsíce (9)	2,0 (± 0,5)	18,1 (± 3,6)	7,4 (± 1,3)	71,2 (± 3,5)	1,2 (± 0,6)
Celkem (43)	3,8 (± 0,5)	32,9 (± 2,8)	7,1 (± 0,9)	55,2 (± 3,1)	0,9 (± 0,2)

*) Průměr hodnot (± střední chyba průměru)

lostra] byla velmi nízká. Přestože bílá krevní složka obsahovala 75,5 % neutrofilů a monocytů, fagocytovalo jen 16,5 % krevních leukocytů s indexem aktivity 0,39. V dalších dnech měla FA vzestupnou tendenci. Ve dvou až pěti dnech věku dosáhla vysokých hodnot, srovnatelných nebo vyšších než u telat tříměsíčních, a to jak počtem fagocytytujících buněk, tak indexem FA. Nejvyšší hodnoty fagocytózy byly zjištěny třetí den, kdy fagocytovalo 43,0 % leukocytů s indexem FA 10,33. Ve věku jednoho týdne fagocytóza leukocytů poklesla, do čtrnáctého dne setrvala na nízké úrovni a teprve nad jeden měsíc věku se opět zvyšovala.

Tab. III udává statistické porovnání rozdílů hodnot jednotlivých věkových skupin telat. Zvýšení procenta fagocytytujících buněk druhý



II. Fagocytární aktivita u telat ve věku 0 dnů až tři měsíce — The phagocytic activity of leucocytes in calves from 0 days to the age of 3 months

Věk telat (počet)	Procento monocytů + neutrofilů	Fagocyty celkem*)		Neutrofilý		Monocyty	
		procento fagocytujících buněk**)	index aktivity***)	procento fagocytujících buněk	index aktivity	procento fagocytujících buněk	index aktivity
0 dní (2)	75,5	16,5 (± 5,5)	0,39 (± 0,17)	22,2 (± 6,7)	0,39 (± 0,19)	0,0 (± 0,0)	0,0 (± 0,0)
1 den (4)	44,8	17,2 (± 9,0)	1,18 (± 0,53)	36,1 (± 7,5)	1,25 (± 0,59)	8,3 (± 8,3)	0,83 (± 0,83)
2 dny (5)	61,0	38,0 (± 10,2)	6,60 (± 1,56)	67,8 (± 11,9)	7,47 (± 1,80)	14,7 (± 9,0)	1,06 (± 0,88)
3 dny (4)	55,6	43,0 (± 4,9)	10,33 (± 3,07)	84,0 (± 9,7)	12,67 (± 3,94)	61,9 (± 7,0)	4,68 (± 1,93)
4 dny (5)	49,6	28,8 (± 10,2)	6,15 (± 3,17)	59,1 (± 12,0)	7,63 (± 4,21)	32,2 (± 10,2)	2,55 (± 1,80)
5 dní (2)	51,5	39,5 (± 11,5)	5,22 (± 1,22)	76,0 (± 21,5)	6,02 (± 1,57)	79,5 (± 12,8)	1,80 (± 1,13)
6–7 dní (3)	42,6	15,3 (± 7,8)	0,75 (± 0,42)	37,3 (± 15,7)	0,81 (± 0,47)	21,9 (± 6,1)	0,22 (±)
3 týdny (9)	33,6	17,2 (± 3,2)	1,61 (± 0,44)	50,5 (± 7,6)	1,83 (± 0,52)	42,3 (± 10,4)	0,72 (± 0,17)
3 měsíce (9)	27,5	18,6 (± 2,5)	7,07 (± 1,17)	66,2 (± 4,8)	9,69 (± 1,84)	45,4 (± 10,7)	2,94 (± 0,44)

*) průměr hodnot (± střední chyba průměru)

**) procento fagocytujících buněk z celé populace bílých krvinek

***) průměrný počet partikulí na jeden fagocyt

III. Statistické srovnání rozdílů hodnot věkových skupin telat Studentovým testem
— A statistical comparison of the differences in the values for the age groups of calves (Student's test)

Srovnávané skupiny	Fagocyty celkem		Neutrofilý		Monocyty	
	procento fagocy-tujících buněk	index aktivity	procento fagocy-tujících buněk	index aktivity	procento fagocy-tujících buněk	index aktivity
0 – 1 dní (6) × × 2 – 5 dní (16)	+	++	++	++	++	++
2 – 5 dní (16) × × 6 – 7 dní (3)	+	++	+	++	–	++
6 – 7 dní (3) × × 3 týdny (9)	–	–	–	–	–	–
3 týdny (9) × × 3 měsíce (9)	–	+	–	+	–	–
0 – 3 týdny (34) × × 3 měsíce (9)	–	+	–	+	–	–

– statisticky nevýznamné ($P < 0,05$)
+ statisticky významné ($P > 0,05$)
++ statisticky vysoce významné ($P > 0,01$)

až pátý den proti hodnotám v nultém až prvním dnu je statisticky významné, u hodnot indexu fagocytární aktivity dokonce statisticky vysoce významné. Stejně významné je i snížení těchto hodnot šestý až sedmý den. Rozdíly od sedmého dne do tří týdnů věku jsou nevýznamné. Od tří týdnů do tří měsíců se procento fagocytujících buněk zvyšuje, ale tento rozdíl je nevýznamný. Zato vysoce významný je vzestup indexu fagocytární aktivity.

Ve druhém pokuse jsme získali několik orientačních hodnot fagocytární aktivity u bezkolostrálních telat. Shodně s výsledky fagocytární

IV. Fagocytární aktivita u dvou telat infikovaných rotavirem experimentálně —
The phagocytic activity in two calves experimentally infected with rotavirus

Tele	PIH	Procento monocy-tů a neu-trofilů	Fagocyty celkem		Neutrofilý		Monocyty	
			procento fagocy-tujících buněk	index aktivity	procento fagocy-tujících buněk	index aktivity	procento fagocy-tujících buněk	index aktivity
ROTA 5	0	75	45,0	2,17	47,3	2,14	50,0	2,50
	24	38	36,0	18,86	100,0	20,37	33,3	1,33
	48	34	30,0	17,64	100,0	21,00	33,3	2,00
ROTA 6	0	59	39,0	3,78	70,9	4,05	0	0
	24	58	56,0	14,48	100,0	14,48	83,3	14,50

PIH — hodiny po infekci

aktivity novorozených telat napájených kolostrem měla novorozená bezkolostrální telata nízkou fagocytární aktivitu krevních leukocytů, a to jak procentem fagocytujících buněk, tak indexem fagocytární aktivity. Tyto nižší hodnoty přetrvávaly i v dalším období a upravily se až později. Druhý až pátý den jsme nezaznamenali vzestup fagocytózy, charakteristický pro telata napájená kolostrem. Ještě v šesti týdnech věku mělo tele odchovávané bez kolostra 7 % fagocytujících buněk s indexem fagocytární aktivity 0,73. Fagocytární aktivita se však výrazně zvyšovala za 24 až 48 hodin po experimentální infekci rotavirem (tab. IV).

DISKUSE

Hodnoty diferenciálního rozpočtu bílých krvinek během fagocytárního testu se u jednotlivých zvířat proti výchozím hodnotám v dané krvi neměnily. Procentuální zastoupení jednotlivých druhů bílých krvinek, výrazná neutrofilie u novorozených telat i její pokles do sedmi dnů věku odpovídají hodnotám udávaným jinými autory (Schalm aj., 1975; Clover a Zarkower, 1980).

Při sledování dynamiky fagocytární aktivity v závislosti na věku jsme našli nízké hladiny u telat novorozených až jeden den starých. La Motte a Eberhart (1976) zjišťovali nízké hladiny FA u novorozených bezkolostrálních telat a uvádějí je v částečné souvislosti s vysokou hladinou kortikosteroidů. Zatímco hladina kortikosteroidů 12 hodin po narození výrazně klesá, FA má vzestupnou tendenci, a to zejména u zvířat napájených kolostrem. Za 36 hodin po narození je již rozdíl ve FA kolostrem napájených a bezkolostrálních telat výrazný. Lombardo aj. (1979) tyto údaje potvrdili a dále sledovali, zda na snížené FA má podíl buněčná složka nebo sérum. Zjistili, že neutrofilie novorozených telat po přidání séra dospělých krav fagocytují se stejnou aktivitou jako buňky telat starých 48 hodin. Výrazné rozdíly však nacházeli v opsonizační schopnosti séra. Sérum novorozených zvířat opsonizační schopnost téměř nemělo, vyšší opsonizaci vykazovala autologní séra 12 až 48 hodin starých telat a nejvyšší opsonizační schopnost měla séra dospělých krav. K podobnému zjištění dospěli i Renshaw aj. (1976), kteří sledovali baktericidní schopnost leukocytů a séra novorozených telat. Zatímco baktericidní schopnost leukocytů nebyla proti leukocytům dospělých zvířat nižší, sérum novorozených zvířat baktericidní schopnost postrádalo.

Od druhého dne jsme zaznamenali výrazný vzestup FA s vrcholem v třetím až pátém dnu s následným poklesem sedmý den po narození. Tutéž dynamiku sledoval Salwa (1982). Tento vzestup jsme ovšem pozorovali jen u telat, která byla napájena kolostrem, zatímco u bezkolostrálních telat se FA udržovala na nižší úrovni delší dobu. Účinek kolostra je zřejmě podobný jako přidání séra dospělých zvířat k buňkám mláďat (Lombardo aj., 1979). Desiderio a Campbell (1980) zjistili, že nejvyšší opsonizační účinek na fagocytózu buňkami mléčné žlázy měla gama frakce kolostra. Je tedy zřejmé, že kolostrum má výrazný potencující účinek na fagocytózu buněk novorozených zvířat, zejména svými humorálními faktory. Tyto faktory již zřejmě neobsahuje mléko, nebo jich obsahuje jen minimální množství, což dokládá útlum

fagocytózy v šestém až sedmém dnu. Úloha buněčné složky kolostru není v tomto směru prozkoumána. Weaver aj. (1981) však zjistili, že je vztah mezi fagocytózou a lymfocyty kolostru, které během fagocytózy uvolňovaly zvýšené množství IgA.

Dosud rozporuplné jsou výsledky při sledování vlivu infekce na fagocytární aktivitu telat. Salwa (1982) nezjistil signifikantní rozdíl mezi skupinou zdravých a nemocných zvířat. Naše výsledky při experimentální infekci bezkolostrálních telat i další zkušenosti se sledováním vlivu průjemových chorob na FA napovídají, že FA periferní krve se zvyšuje i při lokálních infekcích. Tato aktivita se neprojevuje jen zvýšeným vyplavováním neutrofilů do krevního řečiště, ale i zvýšeným indexem FA. Dosavadní poznatky v tomto směru však mají jen orientační charakter a vlivy působící na fagocytární aktivitu novorozených telat je třeba dále sledovat.

Poděkování

Autoři děkují F. Peckovi, promovanému matematikovi, za pomoc při statistickém zpracování dat.

Literatura

- BANKS, K. L.: Host defense in the newborn animal. J. Amer. veter. med. Assoc., 181, 1982, č. 10, s. 1053.
- CLOVER, C. K. — ZARKOWER, M. S.: Immunologic responses in colostrum-fed and colostrum-deprived calves. Amer. J. veter. Res., 40, 1980, s. 1002-1007.
- DESIDERIO, J. V. — CAMPBELL, S. G.: Bovine mammary gland macrophage: effects of colostrum components on phagocytosis. Amer. J. veter. Res., 41, 1980, s. 1600-1602.
- LA MOTTE, G. B. — EBERHART, R. J.: Blood leucocytes, neutrophil phagocytosis, and plasma corticosteroids in colostrum-fed and colostrum deprived calves. Amer. J. veter. Res., 1976.
- LOMBARDO, P. S. — EBERHART, R. J. — TODHUNTER, D. A.: Effect of colostrum ingestion on indices of neutrophil phagocytosis and metabolism in newborn calves. Amer. J. veter. Res., 40, 1979, s. 362-368.
- OPDEBEECK, J. P.: Mammary gland immunity. J. Amer. veter. med. Assoc., 181, 1982, č. 10, s. 1061.
- RENSHAW, H. W. — ECKBLAD, W. P. — THACKER, D. L. — FRANK, F. W.: Antibacterial host defense: *In vitro* interaction of bacteria serum factor, and leucocytes from precolostral dairy calves and their dams. Amer. J. veter. Res., 37, 1976, č. 11, s. 1267.
- SALWA, A.: Wstepne badania nad czynnoscia fagocytarna granulocytow obojetchlonych we krwi cielat noworodkow. Med. veter., XXXVIII, 1982, s. 582-584.
- SCHALM, O. W. — JAIN, N. C. — CARROL, E. J.: Veterinary hematology. Philadelphia, Lea a Febiger 1975, 807 s.
- TOMAN, M. — PŠIKAL, I.: Test fagocytární aktivity krevních leukocytů telat. Veter. Med. (Praha), 30, 1985, č. 7, s. 393-400.
- VĚTVIČKA, V. — FÖRNÜSEK, L. — KOPEČEK, J.: Phagocytosis of human blood leucocytes: a simple micromethod. Immun. Lett., 5, 1982, s. 97-100.
- WEAVER, E. A. — GOLDBLUM, R. M. — DAVIS, C. P. — GOLDMAN, A. S.: Enhanced immunoglobulin release from human colostrum cells during phagocytosis. Infect. Immun., 34, 1981, č. 2, s. 498.
- WELLIVER, R. C. — OGRA, P. L.: Importance of local immunity in enteric infection. J. Amer. veter. med. Assoc., 173, 1978, č. 5, s. 560.

Došlo dne 12. 10. 1984

ТОМАН, М. — ПШИКАЛ, И. — МЕНШИК, Я. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Фагоцитарная активность кровяных лейкоцитов телят от рождения до 3-месячного возраста. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985 (7) : 401-408.

По тесту фагоцитоза 2-гидроксиэтилметакрилатовых (HEMA) частиц исследовали 43 теленка в возрасте 0—3 мес. Отмечены значимые различия фагоцитарной активности кровяных лейкоцитов в связи с возрастом. У новорожденных телят она низкая и охватывает лишь 16,5% лейкоцитов с индексом фаг. активности 0,39. В последующие дни активность заметно возрастает, и в возрасте 3 дня охватывает 43% лейкоцитов телят. На 6—7-й дни активность понижается, и лишь начиная с 3—4 недель снова растет. У безмолозивных телят подобной динамики фагоцитарной активности не отмечено. Низкие величины сохраняются долго после рождения без типичного пика на 3—5-й дни. Фагоцитарная активность повышается у тех безмолозивных телят, которых заражали ротавирусом в экспериментальном порядке.

фагоцитоз; кровь; колострум; теленок; онтогенез иммунитета

TOMAN, M. — PŠIKAL, I. — MENŠÍK, J. (Veterinary Research Institute, Brno): *The Phagocytic Activity of Blood Leucocytes in Calves from Birth to the Age of Three Months*. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985 (7) : 401-408.

Forty-three calves of various age from the day of birth to the age of three months were subjected to the 2-hydroxyethylmetacrylate (HEMA) particle phagocytosis test. Significant differences in the phagocytic activity of blood leucocytes were recorded, all depending on age. New-born calves had very low phagocytic activity: only 16.5% of the leucocytes were found to be phagocytic, the phagocytic index being 0.39. A rapid increase in phagocytic activity was recorded during the subsequent days. At the age of three days 43% of the leucocytes of the calves were phagocytic. A decrease in phagocytic activity was found on the sixth to seventh day, and another increase was recorded only from the age of three to four weeks of age. No such changes in the development of phagocytic activity were observed in the calves reared without colostrum administration. Low values were maintained for a longer time after birth without the typical increase on the third to fifth day. Phagocytic activity increased in the zero-colostrum calves experimentally infected with rotavirus.

phagocytosis; blood; colostrum; calf; immunity ontogenesis

TOMAN, M. — PŠIKAL, I. — MENŠÍK, J. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Phagozytäre Aktivität der Blutleukozyten von Kälbern von der Geburt bis zum Alter von drei Monaten*. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985 (7) : 401-408.

Mit Hilfe des Phagozytose-Testes der 2-Hydroxyäthylmethakrylatkorpuskeln (HEMA) untersuchten wir 43 Kälber verschiedenen Alters, vom nullten Tag bis zu drei Monaten. Wir ermittelten wesentliche Unterschiede der phagozytären Aktivität der Blutleukozyten in Abhängigkeit vom Alter. Bei neugeborenen Kälbern war die phagozytäre Aktivität sehr niedrig, es phagozytierten nur 16,5% der Leukozyten, mit einem Index der phagozytären Aktivität von 0,39. In den folgenden Tagen nahm dann die Aktivität beträchtlich zu. Im Alter von drei Tagen phagozytierten 43% der Leukozyten der Kälber. Am sechsten und siebenten Tag verzeichneten wir einen Aktivitätsrückgang und erst vom Alter von drei Wochen bis einem Monat an wies die phagozytäre Aktivität wiederum ansteigende Tendenz auf. Bei ohne Kolostralmilch aufgezogenen Kälbern wurde diese Dynamik der phagozytären Aktivität nicht verzeichnet. Die niedrigen Werte überdauerten für eine längere Zeit nach der Geburt, ohne die typische Erhöhung am dritten bis fünften Tag. Die phagozytäre Aktivität stieg bei den ohne Kolostrum aufgezogenen Kälbern, die experimentell mit Rotavirus infiziert wurden.

Phagozytose; Blut; Kolostrum; Kalb; Ontogenese der Immunität

Adresa autorů:

MVDr. Miroslav Toman, MVDr. Ivan Pšikal, doc. MVDr. Jaromír Menšík, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

VYUŽITÍ MEMBRÁNOVÝCH FILTRŮ SYNPOR PRO SEPARACI A STANOVENÍ POČTU SOMATICKÝCH BUNĚK MLÉKA DOJNIC INDOL DNA FILTR METODOU

E. Urbanová, V. Šedinová, J. Škarda, O. Škardová, A. Jukl

URBANOVÁ, E. — SEDINOVÁ, V. — ŠKARDA, J. — ŠKARDOVÁ, O. — JUKL, A. (Ústav fyziologie a genetiky hospodářských zvířat ČSAV, Praha; Ústřední státní veterinární ústav, Praha): *Využití membránových filtrů Synpor pro separaci a stanovení počtu somatických buněk mléka dojníc indol DNA filtr metodou*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 409-418.

Somatické buňky mléka dojníc byly separovány filtrací přes nitrocelulóзовé membránové filtry (Synpor) o velikosti pórů 2 až 5 μm . K membránovým filtrům se zachycenými buňkami bylo přidáno indolové činidlo, směs byla zahřáta 20 minut ve vroucí vodní lázni, zchlazena, centrifugována (3500 $\times$ g, 15 min) a optická denzita byla změřena při 490 nm. Pro převod obsahu DNA ve vzorku mléka na počet buněk bylo použito vztahu 8 μg DNA = 1 milión buněk. Průměrný variační koeficient stanovení činil 4,7 % a korelační koeficient mezi indol DNA filtr metodou a přímou mikroskopií na membránových filtrech byl $r = 0,997$. Počet somatických buněk indol DNA filtr metodou lze stanovit ze vzorků mléka uložených ve zmrazeném stavu nebo ve filtrech se zachycenými buňkami, uložených při teplotě 4 °C, krátkodobě (3 dny) i při teplotě 25 °C. Stanovení nenarušuje ani stabilizace vzorků mléka $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ nebo směsí $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a HgCl_2 , jestliže jsou uloženy osm dní při teplotě 4 °C. mléko; somatické buňky; stanovení; DNA filtr metoda; membránové filtry

Filtrací přes membránové filtry byly somatické buňky mléka dojníc poprvé separovány za účelem přímého mikroskopického stanovení jejich počtu [Merrill, 1963]. Hutjens aj. (1970) stanovili počet buněk zachycených na filtru podle obsahu DNA při použití barevné reakce s dyfenylaminem. Ward a Berman (1971) a Ward a Schultz (1973) tuto metodu modifikovali tím, že místo difenylaminu použili jako barevné reagens indol. Použité membránové filtry byly z kyselinorezistentního i tepelně rezistentního akrylonitrilového polymeru. Později se však začaly používat celulózoacetátové membránové filtry [Bremel aj., 1977].

V předložené práci byly pro separaci somatických buněk v mléce použity nitrocelulóзовé membránové filtry domácí produkce. Vyšší reprodukovatelnost indolové barevné reakce s DNA byla zajištěna přidavkem síranu měďnatého do indolového reagens. Některé předložené výsledky již byly stručně uvedeny v dřívějších pracích [Škardová aj., 1978, 1979].

MATERIÁL A METODY

MATERIÁL

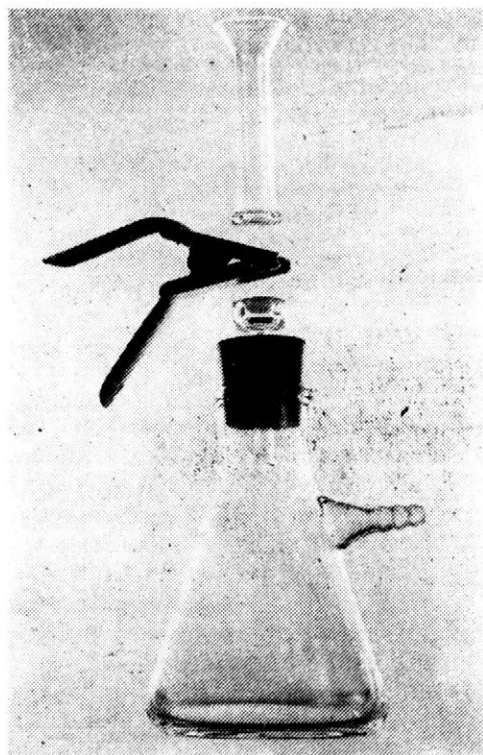
Triton X-100 byl zakoupen od firmy Koch-Light Ltd., England. DNA, použitá pro přípravu standardů, byla vysoce polymerizovaná sodná sůl kyseliny desoxyribonukleové z brzlíku telat (BDH Chemicals Ltd., England). Indol byl získán od firmy Lachema, Brno. Auramin, akridinová žluť a substance Giemsova barviva GURR byly zakoupeny od firmy BDH Chemicals Ltd., England.

Nitrocelulózové membránové filtry Synpor 1 (velikost pórů 3–5 μ), Synpor 2 (velikost pórů 2–3 μ) a Synpor 3 (velikost pórů 1.1–1.9 μ) o průměru 24 mm byly získány z n. p. Labora, Praha nebo z n. p. Zdravotnické zásobování, Praha.

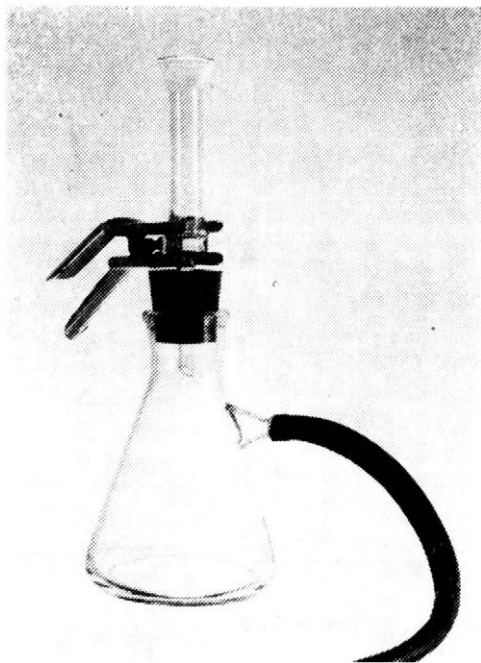
Celoskleněné filtrační zařízení (obr. 1, 2) je modifikací podobného zařízení vyráběného firmou Millipore Intertech Inc., Bedford, Mass., USA a bylo vyrobeno v dílnách ČSAV, Praha. Spodní část zařízení má plochu tvořenou fritou, na kterou se pokládá membránový filtr. Horní část tvoří nálevka, jejíž spodní část je zabroušená, aby při spojení obou částí dobře těsnila. Kovové skřipce, které drží obě části filtračního zařízení pohromadě, byly vyrobeny v dílnách ČSAV, Praha.

MLEKO

K pokusům byly použity čtvercové vzorky mléka od dojníc v různém stadiu laktace. Vzorky mléka pocházely jak od dojníc zdravých, tak od dojníc s mastitidou. Vemeno dojníc bylo omyto a vysušeno; po oddojení prvních stříků mléka byla stanovena reakce MT-NK a odebráno 10 až 200 ml mléka z každé čtvrtě. Pro některé pokusy byly vzorky mléka připraveny takto: čtvercový vzorek mléka



1. Jednotlivé části celoskleněného filtračního zařízení — The parts of the all-glass filtering apparatus



2. Filtrační zařízení připravené k filtraci mléka — The filtering apparatus prepared for milk filtration

s vysokým počtem somatických buněk (zjištěno podle reakce MT-NK) byl v různých poměrech ředěn čtvrtovým vzorkem mléka zdravé dojnice. V takto připravených vzorcích byl pak stanoven počet buněk přímou mikroskopií na filtrech a DNA metodou barevnou reakcí s indolem nebo difenylaminem.

FILTRACE MLÉKA

Před filtrací se smíchá potřebný objem mléka o teplotě 37 až 45 °C s 0,1% roztokem Tritonu X-100, zahřátého na teplotu 65 až 70 °C. Triton je detergent, který redukuje velikost tukových kuliček, a tím usnadňuje filtraci mléka. Vodní vývěvou je směs mléka a Tritonu filtrována tak, že somatické buňky zůstávají na filtru. Filtr je ještě promyt 10 ml fyziologického roztoku, aby byl zbaven zbytků detergentů.

STANOVENÍ DNA SOMATICKÝCH BUNĚK ZACHYCENÝCH NA FILTRU BAREVNOU REAKCÍ S INDOLEM

Stanovení DNA somatických buněk barevnou reakcí s indolem bylo provedeno podle Warda a Schultze (1973) s tím rozdílem, že do roztoku indolu pro přípravu indolového činidla bylo přidáno 60 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ síranu měďnatého (CuSO_4), jak doporučují Short aj. (1968) pro stanovení DNA ve tkáňových extraktech. Podle těchto autorů způsobuje různý obsah mědi v destilované vodě používané k mytí zkumavek a k přípravě indolového činidla kolísání hodnoty extinkce DNA. Filtry se zachycenými buňkami byly přeneseny do zkumavek, do kterých bylo přidáno 5 ml čerstvě připraveného indolového činidla, složeného z

1 dílu indolu (0,06 %), který obsahoval 60 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ CuSO_4 (roztok je stabilní 60 dní při teplotě 4 °C — Ward a Schultz, 1973),

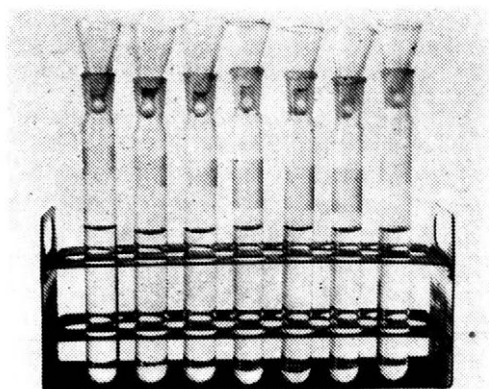
1 dílu 5N-HCl,

2 dílů destilované vody.

Zkumavky s filtry, přikryté kónickými skleněnými chladiči (obr. 3), byly zahřívány po dobu 20 minut ve vroucí lázni. Po ochlazení ve vodě a centrifugaci při 3500 X g po dobu 15 minut byla optická denzita měřena na spektrofotometru Spekol (Zeiss Jena, NDR) nebo na spektrofotometru Spektromom (MOM, Budapešť, MLR) při 490 nm. Současně se vzorky byly vařeny i filtry promyté Tritonem X-100 a fyziologickým roztokem, které sloužily jako slepý pokus, a filtry promyté stejným způsobem, spolu s 10 až 100 μg DNA, které sloužily jako standardy.

PŘÍPRAVA STANDARDŮ

Zásobní roztok DNA připravíme rozpuštěním 5 mg DNA v 10 ml destilované vody. Tento roztok je skladován při teplotě -20 °C. Standardy připravíme ze zásobního roztoku DNA (500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) rozpípetováním do zkumavek s promytými filtry v množství 20 až 200 μl (10–100 μg DNA).



3. Kónické chladiče na zkumavkách —
Conical coolers on test-tubes

STANOVENÍ POČTU SOMATICKÝCH BUNĚK MLÉKA PŘÍMOU MIKROSKOPIÍ NA FILTRU

Přímá mikroskopie somatických buněk zachycených na membránovém filtru (Synpor 2 nebo 3) byla provedena podle Šedínové aj. (1984, 1985).

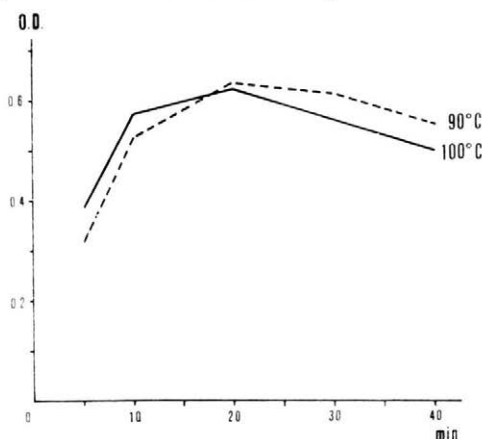
VÝSLEDKY

Při použití našeho filtračního zařízení je směs mléka a Tritonu X-100 filtrována na plochu 2,27 cm² membránového filtru. Jestliže je směs filtrována po částech, je filtr Synpor 1 blokován 28 milióny a filtr Synpor 2 30 milióny somatických buněk. Při filtraci celého objemu směsi mléka a Tritonu najednou se filtr Synpor 1 blokuje již 14 milióny a filtr Synpor 2 16 milióny somatických buněk.

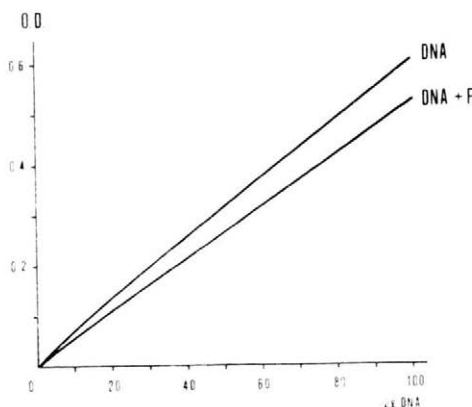
Během vaření filtrů Synpor s indolovým činidlem se uvolňují drobné částičky filtru, které způsobují opalescenci vzorků. Ta znemožňuje správné odečtení hodnoty extinkce při fotokolorimetrickém měření. Centrifugací (3500 x g, 15 min) se opalescence odstraní: optická denzita vzorku s filtrem klesne z $0,149 \pm 0,016$ před centrifugací na $0,053 \pm 0,001$ po centrifugaci (Spektromom, kyveta 1 cm).

Vliv doby a teploty zahřívání na optickou denzitu 100 μ g DNA s indolovým činidlem ukazuje obr. 4. Maximální extinkce je dosaženo ve 20 minutách. Prodloužením doby zahřívání na 30 až 40 minut se extinkce snižuje, a to rychleji při teplotě 100 °C než při teplotě 90 °C.

Obr. 5 ukazuje vztah mezi kalibrační křivkou standardů DNA v přítomnosti a nepřítomnosti membránových filtrů. Z obrázku je patrné, že průběh kalibrační křivky standardů DNA je přítomností filtrů ovlivněn



4. Vliv doby a teploty zahřívání na optickou denzitu 100 μ g DNA s indolovým činidlem. Vzorky byly měřeny při 490 nm v kyvetě 1 cm na přístroji Spektromom (MOM, Maďarsko) — The relation between the warming time and temperature and the optical density of 100 μ g DNA with indole agent. The samples were measured at 490 nm in a 1cm cell on the Spektromom apparatus (MOM, Hungary)



5. Vztah mezi optickou denzitou a různými koncentracemi DNA v přítomnosti a nepřítomnosti membránového filtru Synpor 1. Vzorky byly měřeny na spektrofotometru Spekol (Zeiss, NDR) při 490 nm v kyvetě 2 cm. F = nitrocelulózový membránový filtr Synpor 1 — The relation between the optical density and various DNA concentrations in the presence and absence of the Synpor 1 membrane filter. The samples were measured on the Spekol spectrophotometer (Zeiss, GDR) at 490 nm in a 2cm cell. F = nitrocellulose membrane filter Synpor 1

I. Stanovení počtu somatických buněk v mléce přímou mikroskopií na filtrech a indol DNA filtr metodou — Estimation of somatic cells in milk by direct microscopy on filters and by the indole DNA filter method

Vzorek číslo	PM		DNA indol		
	počet buněk. 10^3 . $\text{ml}^{-1} \pm \text{SD}$	variační koeficient %	filtrovaný objem mléka (ml)	počet buněk. 10^3 . $\text{ml}^{-1} \pm \text{SD}$	variační koeficient %
1	55 $\pm$ 2	3,6	20	53 $\pm$ 1	1,9
2	146 $\pm$ 16	10,9	20	118 $\pm$ 6	5,1
3	429 $\pm$ 48	11,2	5	423 $\pm$ 16	3,8
4	512 $\pm$ 32	6,3	2,5	482 $\pm$ 32	6,6
5	787 $\pm$ 48	6,1	2,5	808 $\pm$ 47	5,8
6	866 $\pm$ 35	4,0	2,5	788 $\pm$ 22	2,8
7	1145 $\pm$ 114	10,0	2,5	1248 $\pm$ 63	5,0
8	1767 $\pm$ 154	8,7	2,5	1950 $\pm$ 108	5,5
Průměr		7,6			4,6

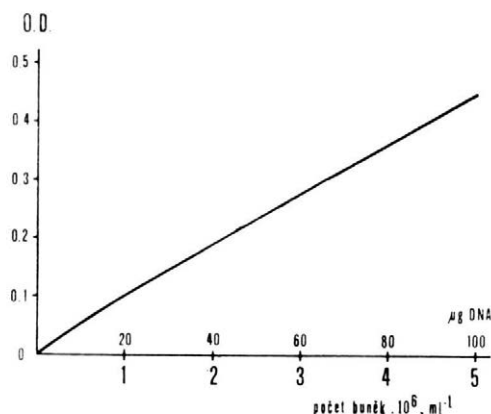
Výsledky stanovení počtu somatických buněk v mléce indol DNA filtr metodou jsou průměry tří až šesti stanovení $\pm \text{SD}$. Přímou mikroskopií (PM) byl každý vzorek počítán na třech filtrech. V tabulce jsou uvedeny průměry těchto stanovení $\pm \text{SD}$. Korelační koeficient mezi výsledky přímé mikroskopie na filtru a indol DNA filtr metody byl $r = 0,997$.

a že je proto nezbytné sestavovat kalibrační křivku DNA z extinkcí naměřených v přítomnosti membránových filtrů.

Pro zjednodušení převodu zjištěných extinkcí na počet buněk v mléce je možné na osu x kalibrační křivky vynést místo μg DNA přímo počet buněk na mililitr mléka. Obr. 6 uvádí příklad pro filtrovaný objem vzorku mléka 25 ml. Jestliže např. nalezneme u vzorku extinkci, která odpovídá 20 μg DNA, znamená to, že v každém mililitru mléka je 8 μg DNA, tedy 1 milión buněk. Na obr. 6 je tedy na ose x vyznačen 1 milión buněk na mililitr místo 20 μg DNA.

Pro převod obsahu DNA ve vzorku mléka bylo použito vztahu 8 μg DNA = 1 milión somatických buněk, protože tato hodnota nejlépe odpovídá počtu buněk zjištěnému přímou mikroskopií (tab. I a II).

6. Vztah mezi optickou densitou a počtem somatických buněk na ml mléka pro filtrovaný objem 2,5 ml při použití indol DNA filtr metody. Pro přepočet μg DNA na počet somatických buněk bylo použito vztahu 8 μg DNA = 1 milión buněk — The relation between the optical density and the counts of somatic cells per ml of milk for a 2.5ml filtered volume — the indole DNA filter method. The relation 8 μg DNA = 1 million cells was used for the conversion of the μg amount of DNA to the counts of somatic cells



II. Výsledky stanovení počtu somatických buněk v mléce přímou mikroskopií na filtru a indol DNA filtr metodou, získané dvěma operátory — Results of the estimation of the counts of somatic cells in milk by direct microscopy on filter and by the indole DNA filter method, as obtained by two operators

Vzorek číslo	Operátor I		Operátor II		Průměrný variační koeficient ‰
	PM filtry $\bar{x} \pm SD$	variační koeficient ‰	PM filtry $\bar{x} \pm SD$	variační koeficient ‰	
1	146 $\pm$ 16	10,9	149 $\pm$ 29	19,5	15,2
2	429 $\pm$ 48	11,2	392 $\pm$ 50	12,8	12,0
3	866 $\pm$ 35	4,0	805 $\pm$ 56	7,0	5,5
Průměr		8,7		13,1	
	DNA indol $\bar{x} \pm SD$		DNA indol $\bar{x} \pm SD$		průměrný variační koeficient ‰
	DNA indol $\bar{x} \pm SD$	variační koeficient ‰	DNA indol $\bar{x} \pm SD$	variační koeficient ‰	
1	124 $\pm$ 1	0,8	118 $\pm$ 6	5,1	3,0
2	407 $\pm$ 1	0,2	423 $\pm$ 16	3,8	2,0
3	850 $\pm$ 22	2,6	788 $\pm$ 22	2,8	2,7
Průměr		1,2		3,9	

Mléko určené pro stanovení počtu somatických buněk přímou mikroskopií na filtru bylo barveno kombinací May-Grünwaldova a Giemsova barviva. Na každém filtru bylo počítáno v závislosti na počtu buněk 40 až 140 zorných polí. Hodnoty v tabulce, získané přímou mikroskopií na filtru (PM filtry) i indol DNA filtr metodou (DNA indol), představují průměry tří stanovení počtu buněk. $10^3 \cdot \text{ml}^{-1} \pm SD$.

Při filtrovaném objemu 2,5 ml mléka lze indolovou metodou dostatečně přesně stanovit počet buněk v těch vzorcích mléka, které obsahují více než 400 tisíc somatických buněk v mililitru, což odpovídá extinkci vyšší než 0,040. Přesnost stanovení ve vzorcích mléka s nižším počtem buněk je možné zvýšit měřením extinkce v kyvetě o tloušťce 2 až 3 cm nebo zvětšením objemu filtrovaného mléka.

V tab. I jsou porovnávány výsledky stanovení počtu somatických buněk v rozsahu od 55 000 do 1 767 000 v mililitru mléka přímou mikroskopií na filtrech a indol DNA filtr metodou. Výsledky stanovení jsou vzájemně ve velmi dobré shodě; korelační koeficient mezi oběma metodami činil 0,997. Variační koeficient stanovení počtu buněk indol DNA filtr metodou činil pouze 4,6 %.

V tab. II jsou porovnávány výsledky dvou operátorů při stanovení počtu buněk ve stejných vzorcích mléka přímou mikroskopií na filtrech a indol DNA filtr metodou. Operátor II měl poněkud vyšší variabilitu ve stanovení přímou mikroskopií, ale rozdíl ve výsledcích obou operátorů nebyl významný.

Skládování mléka při teplotě -20°C nebo membránových filtrů se zachycenými buňkami při teplotě 4°C nebo -20°C po dobu 10 dní neovlivnilo stanovení počtu buněk indol DNA filtr metodou (tab. III).

III. Vliv skladování mléka nebo membránových filtrů se zachycenými buňkami na výsledek stanovení počtu somatických buněk indol DNA filtr metodou — The effect of the storage of milk, or membrane filters with collected cells, on the result of the estimation of the counts of somatic cells by the indole DNA filter method

Doba skladování (dny)	Mléko	Filtry se zachycenými buňkami	
	skladované při teplotě -20°C	skladované při teplotě 4°C	skladované při teplotě -20°C
3	650 ± 44	679 ± 35	675 ± 29
7	714 ± 25	729 ± 48	668 ± 50
10	661 ± 33	679 ± 71	677 ± 52

Počet somatických buněk v čerstvém mléce, stanovený přímou mikroskopií na filtru ($n = 7$), činil $670 \pm 62 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$, indol DNA filtr metodou $738 \pm 45 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$. Hodnoty v tabulce jsou průměry sedmi stanovení počtu somatických buněk $\cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1} \pm \text{SD}$.

Membránové filtry se zachycenými buňkami mohou být až tři dny skladovány i při pokojové teplotě, aniž by výsledek stanovení byl ovlivněn. Ve vzorku mléka, ve kterém bylo přímou mikroskopií na filtru ($n = 4$) zjištěno $1144 \pm 94 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ somatických buněk, bylo po třech dnech skladování filtru se zachycenými buňkami při pokojové teplotě stanoveno indol DNA filtr metodou $1219 \pm 92 \cdot 10^3$ buněk na mililitr. Mléko stabilizované dvojchromanem draselným ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) nebo směsí dvojchromanu draselného a chloridu rtuťnatého ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HgCl}_2$) mohlo být použito pro stanovení počtu buněk DNA filtr metodou ještě po osmi dnech skladování při teplotě 4°C a v případě, kdy byl použit samotný dvojchroman draselný, i po třech dnech skladování při teplotě 25°C (tab. IV).

DOPORUČENÝ POSTUP STANOVENÍ SOMATICKÝCH BUNĚK V MLÉCE INDOL DNA FILTR METODOU

Zkumavky, ve kterých jsou vařeny a dále zpracovávány membránové filtry s indolovým činidlem, musí být dokonale umyté. Je nutné umýt je v Jaru nebo v jiném detergentu, několikrát vypláchnout vodou z vodovodu a destilovanou vodou, povařit v destilované vodě a usušit.

Membránové filtry Synpor 1 nebo 2 povaříme v destilované vodě a pak propláchneme destilovanou vodou. Při manipulaci s filtry používáme pinzetu.

Filtrace mléka a barevná reakce DNA s indolem se dělají takto:

1. 0,1% roztok Tritonu X-100 (1 ml Tritonu ad 1000 ml destilované vody) zahřejeme na teplotu 65 až 70°C .

2. Smísíme potřebné množství mléka zahřátého na teplotu 37 až 45°C s teplým Tritonem v poměru nejméně $1:4$. Množství mléka pro stanovení se odhaduje podle výsledku MT-NK. Při negativní reakci MT-NK je pro stanovení použito více než 5 ml mléka; při reakci $\pm$, $+$ a $++$ je použito 2,5 až 5,0 ml mléka, při reakci $+++$ méně než 2,5 ml mléka.

3. Na fritu spodní části filtračního zařízení položíme předem smočený membránový filtr, kovovým skřipcem připojíme horní část filtračního zařízení a zapojíme vývěvu.

IV. Vliv chemické stabilizace a skladování mléka na stanovení počtu somatických buněk indol DNA filtr metodou — The effect of the chemical stabilization and storage of milk on the estimation of the counts of somatic cells by the indole DNA filter method

Stabilizátor	Teplota skladování	Doba skladování	
		3 dny	8 dní
$K_2Cr_2O_7$	4 °C	1044 ± 38	1016 ± 19
	25 °C	1091 ± 19	660 ± 12
$K_2Cr_2O_7 + HgCl_2$	4 °C	1110 ± 12	1063 ± 14
	25 °C	844 ± 13	319 ± 22

K pokusům bylo použito mléko, ve kterém bylo přímou mikroskopií na filtru ($n = 4$) zjištěno $1144 \pm 94 \cdot 10^3 \cdot ml^{-1}$ somatických buněk. Hodnoty v tabulce jsou průměry čtyř stanovení počtu somatických buněk $\cdot 10^3 \cdot ml^{-1} \pm SD$ indol DNA filtr metodou. $K_2Cr_2O_7$ byl použit v množství 52 mg na 50 ml mléka a $HgCl_2$ v množství 12 mg na 50 ml mléka.

4. Směs mléka s Tritonem zfiltrujeme přes membránový filtr. Po filtraci opláchneme filtrační zařízení cca 10 ml fyziologického roztoku.

5. Po sejmutí skřípce a horní části filtračního zařízení přeneseme pinzetou membránový filtr se zachycenými somatickými buňkami do zkumavky. Zkumavky s filtry je možné skladovat až 10 dní při teplotě 4 °C a tři dny při teplotě 25 °C.

6. Do zkumavek přidáme bezprostředně před vařením 5 ml čerstvě připraveného indolového činidla.

7. Zkumavky protřepeme, překryjeme skleněnými kónickými chladíči a povaříme ve vodní lázni po dobu 20 minut.

8. Zchladíme ve vodě.

9. Obsah zkumavek přelijeme do centrifugačních zkumavek a centrifugujeme při 3500 x g po dobu 15 minut.

10. Supernatant přelijeme do čistých zkumavek a měříme optickou densitu vzorku na spektrofotometru při 490 nm proti slepému pokusu (čistý membránový filtr zpracovaný stejně jako vzorky).

11. Z kalibrační křivky odečteme hodnoty počtu somatických buněk na mililitr mléka.

DISKUSE

Základním předpokladem pro úspěšné využívání počtu somatických buněk v mléce ke sledování zdravotního stavu dojců je přesná metoda jeho stanovení. V současné době jsou ve velkých laboratořích k dispozici automatické počítače, ale tyto přístroje jsou velmi nákladné, takže si je malé laboratoře nemohou koupit. V malých laboratořích by bylo možné pro stanovení počtu somatických buněk v mléce využít DNA filtr metody, která nevyžaduje speciální vybavení laboratoře; pro hodnocení stačí kolorimetrie Spekol, popřípadě Spektromom.

Na základě našich výsledků je zřejmé, že pro stanovení počtu somatických buněk v mléce indol DNA filtr metodou jsou vhodné membránové filtry Synpor 1 nebo 2. Na 2,27 cm² plochy filtru je možné zfiltr-

vat jednorázovým nalitím vzorek mléka s celkovým počtem buněk zhruba do 14 miliónů. Vzorky s vyšším počtem buněk již blokují filtr, a proto je nutné je aplikovat do filtračního zařízení přerušovaně, nebo lépe snížit objem vzorku mléka.

Vzhledem k tomu, že z membránových filtrů Synpor se během vaření s indolovým činidlem uvolňují drobné částice, které způsobují opalescenci vzorků, je nutné před fotokolorimetrickým měřením vzorky centrifugovat.

Nitrocelulózové membránové filtry Synpor snižují extinkci barevné reakce indolu s DNA. Proto je třeba zahřívát slepý pokus a standardy DNA s indolovým činidlem v přítomnosti membránových filtrů Synpor.

Ze srovnání výsledků stanovení počtu somatických buněk přímou mikroskopií na filtrech a indol DNA filtr metodou vyplynulo, že pro převod obsahu DNA ve vzorku mléka na počet buněk je nejvhodnější vztah $8 \mu\text{g DNA} = 1 \text{ milión buněk}$.

Aby se zajistila přesnost indol DNA filtr metody, je nutné objem vzorku mléka zvýšit až na 20 ml u vzorků s negativní reakcí MT-NK, zatímco objem vzorků mléka s vysoce pozitivní reakcí MT-NK je třeba snížit na 2,5 ml a méně.

Stanovení počtu somatických buněk v mléce indol DNA filtr metodou je jednoduché, objektivní a přesné. Měření lze velmi snadno standardizovat tím, že se připraví standardní roztoky DNA centrálně a jednotlivým laboratořím se zašlou zkumavky s odpařenými standardy pro kalibraci. Výhodou je také možnost stanovit DNA ve vzorcích mléka skladovaných ve zmrazeném stavu nebo ve filtrech se zachycenými buňkami, uloženými při teplotě 4°C po dobu až deseti dnů. Filtry se zachycenými somatickými buňkami mohou být skladovány po dobu tří dnů i při pokojové teplotě, aniž by byl výsledek stanovení ovlivněn. K podobným závěrům došli i Ward a Schultz (1973). Stabilizace mléka dvojchromanem draselným nebo směsí dvojchromanu draselného a chloridu rtuťnatého nenarušuje stanovení počtu somatických buněk v mléce skladovaném při teplotě 4°C indol DNA filtr metodou, ale stabilizace mléka formaldehydem není pro následné stanovení indol DNA filtr metodou vhodná (naše nepublikované výsledky).

I při použití pouze jednoho filtračního zařízení v laboratořích, které nejsou vybaveny automatickými dávkovači, event. průtokovými kvetami, může jeden pracovník analyzovat indol DNA filtr metodou 200 vzorků za tři dny, včetně přípravy reagentů apod.

Literatura

- BREMEL, R. D. — SCHULTZ, L. H. — GABLER, F. R. — PETERS, J.: Estimating somatic cells in milk samples by the membrane-filter-DNA procedure. *J. Fd Protect.*, 40, 1977, s. 32-38.
- HUTJENS, M. F. — SCHULTZ, L. H. — WARD, G. E. — YAMDAGNI, S.: Estimation of somatic cells in milk using membrane filter separation and DNA determination with diphenylamine. *J. Milk Fd Technol.*, 33, 1970, s. 227-231.
- MERRILL, E. P.: Estimating bacteriological quality of milk by direct microscopic examination of membrane filters. *J. Dairy Sci.*, 46, 1963, s. 601-602.
- SHORT, E. C. — WARNER, H. R. — KOERNER, J. F.: The effect of cupric ions on the indole reaction for the determination of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 243, 1968, s. 3342-3344.
- ŠEDINOVÁ, V. — ŠKARDA, J. — ŠKARDOVÁ, O. — URBANOVÁ, E. — BÍLEK, J.: Direct enumeration of milk somatic cells collected on membrane filters. *Arch. exp. Veter.-Med.*, 38, 1984, s. 884-893.

ŠKARDOVÁ, O. — URBANOVÁ, E. — ŠKARDA, J.: Stanovení počtu buněk v mléce dojníc na základě obsahu DNA. In: Sbor. věd. Prací ÚSVÚ, 1979, č. 9, s. 41-46.
ŠEDINOVÁ, V. — URBANOVÁ, E. — ŠKARDA, J. — JUKL, A.: Stanovení počtu somatických buněk v mléce rychlou difenylamin DNA filtr metodou. Veter. Med. (Praha), 30, 1985, v tisku.

ŠKARDOVÁ, O. — URBANOVÁ, E. — ŠKARDA, J. — BÍLEK, J.: Separace somatických buněk mléka dojníc filtrací a stanovení DNA difenylaminem a indolem. Českoslov. Fysiol., 27, 1978, s. 273.

WARD, G. E. — BERMAN, D. T.: Comparison of methods for estimating somatic cell levels in bulk milk. J. Milk Fd Technol., 34, 1971, s. 482-484.

WARD, G. E. — SCHULTZ, L. H.: Estimation of somatic cells in milk by filter-deoxyribonucleic acid method with indole. J. Dairy Sci., 56, 1973, s. 1097-1011.

Došlo dne 28. 6. 1984

УРБАНОВА, Э. — ШЕДИНОВА, В. — ШКАРДА, Й. — ШКАРДОВА, О. — ЮКЛ, А. (Институт физиологии и генетики сельскохозяйственных животных АН ЧССР, Прага; Центральный государственный ветеринарный институт, Прага): Применение мембранных фильтров Синпор в сепарации и определении количества соматических клеток в молоке коров по индол-фильтрметоду DNA. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 409-418.

Соматические клетки молока сепарировали путем фильтрации через нитроцеллюлозные мембранные фильтры (Синпор) размерами ячеек 2—5 μm . К фильтрам с задержанными клетками добавляли индолрегент, и смесь нагревали 20 мин. в кипящей воде, охлаждали, центрифугировали (3500 $\times g$, 15 мин.), оптическую плотность измеряли при 490 нм. Для перевода содержания DNA в молочной пробе на число клеток использовали отношение 8 μg DNA = 1 млн клеток. Средний вариационный коэффициент определения = 4,7 %, а коэффициент корреляции между индол DNA по фильтрметоду и прямой микроскопией на мембранных фильтрах $r = 0,997$. Число соматических клеток можно определять по этому методу из молочных проб в замороженном состоянии или же в фильтрах с задержанными клетками, хранимых при 4 °C, короткий срок (3 дня) и при 25 °C. Определение не нарушает даже стабилизация пробы посредством $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ или смесью его с HgCl_2 , если она хранится 8 дней при 4 °C.

молоко; соматические клетки; определение; DNA фильтрметод; мембранные фильтры

URBANOVÁ, E. — ŠEDINOVÁ, V. — ŠKARDA, J. — ŠKARDOVÁ, O. — JUKL, A. (Institute of Animal Physiology and Genetics, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha; Central State Veterinary Institute, Praha): The Use of the Synpor Membrane Filters for Separation and Estimation of Milk Somatic Cells of Dairy Cows by the Indole DNA Filter Method. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 409-418.

The somatic cells of cow's milk were separated by filtering through nitrocellulose membrane filters (Synpor), pore size 2 to 5 μm . An indole reagent was added to the membrane filters with trapped cells, the mixture was warmed in boiling water bath for 20 min., then cooled, centrifuged (3500 $\times g$, 15 min.), and optical density was measured at 490 nm. The relation 8 μg = 1 million cells was used for the conversion of DNA content in sample to the counts of cells. The average variation coefficient of the determination was 4.7 % and the coefficient of correlation between the indole DNA filter method and direct microscopy on membrane filters was $r = 0.997$. Using the indole DNA filter method, the counts of somatic cells can be estimated from milk samples kept frozen or from filters with retained cells kept at 4 °C, or (for a short time — 3 days) at 25 °C. The estimation is not distorted when the milk samples are stabilized with $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ or a mixture of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ and HgCl_2 , if they are kept at 4 °C for eight days.

milk; somatic cells; estimation; DNA filter method; membrane filters

Adresy autorů:

Eva Urbanová, ing. Věra Šedinová, MVDr. Josef Škarda, CSc., ing. Alexandr Jukl, CSc., Ústav fyziologie a genetiky hospodářských zvířat ČSAV, Přátelství 560, 251 61 Praha-Uhřetěves

MVDr. Olga Škardová, Ústřední státní veterinární ústav, Sídlištní 156, 165 03 Praha-Lysolaje

PŘEŽÍVÁNÍ VIRU AUJESZKYHO CHOROBY (ACH) V INFIKOVANÉ PRASEČÍ KEJDĚ

B. Šmíd, L. Valíček, L. Rodák, E. Jurák, I. Herzig, L. Dvořáček

ŠMÍD, B. — VALÍČEK, L. — RODÁK, L. — JURÁK, E. — HERZIG, I. — DVOŘÁČEK, L. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Okresní veterinární zařízení, Louny): *Přežívání viru Aujeszkyho choroby (ACH) v infikované prasečí kejdě*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 419-424.

Bylo prokázáno, že virus Aujeszkyho choroby (ACH) po experimentální infekci prasečí kejdy z podroštových prostor v infekční dávce 10^6 PFU . ml⁻¹ přežíval při teplotě 15 °C a pH 6,5 po dobu 72 hodin, ale inaktivoval se za 96 hodin. V technologicky upravené zvodněné prasečí kejdě z retenčních nádrží po experimentální infekci dávkou viru ACH 10^5 PFU . ml⁻¹ virus přežíval při teplotě +15 °C i +4 °C a pH 6,8 po dobu 23 dnů, ale inaktivoval se za stejných podmínek za 30 dnů. Při snížení infekční dávky viru ACH v technologicky upravené prasečí kejdě z retenčních nádrží na 10^4 PFU . ml⁻¹ a při teplotě +4 °C a pH 7,0 i 8,0 virus přežíval 16 dnů, ale inaktivoval se za 23 dny po infekci.

virus Aujeszkyho choroby; přežívání viru; prasečí kejda; velkovýrobní technologie

Přežívání viru Aujeszkyho choroby (ACH) v prasečích exkrementech, tj. v moči, močůvce a trusu, za různých teplot sledoval K r e t z s c h m a r (1970). Zjistil, že při teplotě +20 °C přežívá virus v moči až 20 dnů, v arteficiálně připravené močůvce až 14 dnů a v trusu až 60 dnů. Při snížení teploty na +4 °C pozoroval, že virus přežívá v moči až 90 dnů, v arteficiálně připravené močůvce až 28 dnů a v trusu až 93 dny. Při teplotě -20 až -28 °C přežíval virus v moči až 6 dnů, v arteficiálně připravené močůvce až 15 dnů a v trusu až 60 dnů. Naproti tomu T h a w l e y a j. (1982) s odkazem na disertační práci F r e u n d o v u (1981) uvádějí, že v materiálu kontaminovaném trusem a močí přežije virus ACH několik hodin, v odpadních jímkách přežívá méně než 48 hodin a na čistém betonu, zelených rostlinách a na dobře usušeném senu je rychle inaktivován. Přežívání viru na seně, dřevěných předmětech, otrubách nebo zrní věnovali pozornost S o l o m k i n a T u t u š i n (1956) a zjistili, že virus přežil při teplotě -8 °C 46 dnů, při teplotě +14 až +18 °C 30 dnů a při teplotě +25 °C 10 až 30 dnů. Podle U s t e n k a (1957) si virus udržuje virulenci na dřevěných nástrojích v závislosti na teplotě a vlhkosti po dobu 14 až 18 dnů. Přežívání viru ve fermentovaném odpadu z jídelen uvádějí ve své práci W o o l e y a j. (1981). Zjistili, že virus ACH se inaktivuje při teplotě +20 a +30 °C během 24 hodin, ale přežívá 48 hodin při teplotě +10 °C a 96 hodin při teplotě +5 °C. D a v i e s a B e r a n (1981) sledovali přežívání viru ACH ve

vnějším prostředí a zjistili závislost na pH a na teplotě. Inaktivace viru probíhala od hodnot 0,04 log₁₀ za den při teplotě +4 °C do hodnoty 0,6 log₁₀ za den při teplotě +37 °C a při optimálním pH 6,0 až 8,0. Při stálé teplotě -13 °C se virus rychle inaktivoval při všech testovaných hodnotách pH.

Při ozdravování chovů prasat od Aujeszkyho choroby (ACH) jsou epizootologické a ekologické aspekty koloběhu viru ACH ve velkochovech a v oblastech s vysokou koncentrací zvířat značně složité. V takových oblastech a především tam, kde v minulosti byla vysoká incidence a prevalence této nákazy, nelze vyloučit možnost recidiv. Kromě prasat, která jsou hlavním zdrojem šíření nákazy, existují i další faktory, které zatím nebyly zcela odhaleny a doceněny nebo unikají pozornosti, či naopak je mnoho potenciálních možností šíření viru přeceňováno. Při ozdravování jednoho velkochovu, klidového ohniska ACH, jsme byli postaveni před otázku, za jakých podmínek je možné použít upravenou kejdu k závlahám. Proto bylo cílem naší práce zjistit dobu přežívání a samovolné inaktivace viru ACH v technologicky upravené prasečí kejdě.

MATERIÁL A METODY

ODBĚR VZORKŮ

Vzorky prasečí kejdy byly odebírány z klidového ohniska ACH v SZP Líšany na okrese Louny ve třech časových intervalech. V prvním časovém intervalu byl odebrán vzorek kejdy z podroštových prostor (vzorek 1), ve druhém z retenční nádrže I (vzorek 2) a ve třetím jak z retenční nádrže I (vzorek 3), tak i z retenční nádrže II (vzorek 4). Do retenčních nádrží přichází kejda, která prošla separátorem pevných částic. Ve všech případech bylo odebíráno po 1000 ml do NTS lahví.

CHEMICKÝ ROZBOR VZORKŮ

Ve směsném vzorku zvodněné prasečí kejdy byly stanoveny dusíkaté látky, tuk, vláknina a popel podle ČSN 46 7007 (1967).

INFEKCE A ODBĚR VZORKŮ

Vzorek kejdy z podroštových prostor (vzorek 1) byl infikován virem ACH virulentního kmene DK-M, pomnoženého na buněčné linii králíčích ledvinových buněk RK 13. Konečná koncentrace viru byla 10⁶PFU . ml⁻¹ kejdy při pH 6,5. Infikovaná kejda byla udržována při teplotě +15 °C a za 1, 2, 20, 44, 72, 96 a 120 hodin byly vždy zpracovány 3 ml kejdy a použity k infekci králíků.

K infekci vzorku z retenční nádrže I (vzorek 2) byl použit virulentní kmen B 3 viru ACH v konečné koncentraci 10⁵PFU . ml⁻¹ kejdy při pH 6,8. Část vzorku byla udržována při teplotě +15 °C, druhá část při teplotě +4 °C. Za 1, 5, 9, 16, 23, 30 a 37 dnů po infekci virem ACH byly odebírány 3 ml kejdy a po zpracování byly použity k infekci králíků.

K infekci vzorku 3 a 4 byl použit kmen B 3 viru ACH v konečné koncentraci 10⁴PFU na mililitr kejdy. Dva stejné objemy vzorku 3 byly před infekcí viru upraveny 0,1M NaOH na pH 7,0 a vzorek 4 byl upraven na pH 7,0. Vzorky byly udržovány při teplotě +4 °C a za 3, 9, 16, 23 a 30 dnů z nich byly odebírány 3 ml kejdy a po zpracování byly použity k infekci králíků.

ZPRACOVÁNÍ ODEBRANÝCH INFIKOVANÝCH VZORKŮ

V uvedených časových intervalech byly odebírány 3 ml objemu vzorků, které byly ihned odstředěny na chlazené centrifúze při teplotě +4 °C a otáčkách 12 000 X g po dobu pěti minut. Supernatant byl doplněn antibiotiky (10 000 j. penicilinu G a 20 mg streptomycinu na 3 ml) a ponechán jednu hodinu při teplotě

+4 °C. Potom bylo aplikováno po 1 ml každého vzorku i. m. jednomu králíkovi (vzorek 1) nebo dvěma králíkům (vzorek 2, 3 a 4). Bylo použito plemene stříbrného králíka o hmotnosti 1,5 kg.

PRŮKAZ VIRU U KRÁLÍKŮ

Z uhynulých králíků byl odebrán buď jen mozek s prodlouženou míchou (vzorek 1 a 2), nebo mozek s prodlouženou a bederní míchou (vzorek 3 a 4). Z odebraného materiálu byla zhotovena 10% suspenze v Earlově médiu bez séra, z níž byl po mírném odstředění získán supernatant k infekci buněčných kultur (kuřecí embryonální buňky nebo linie králíčních ledvinových buněk RK 13). Specifita pozitivního cytopatického efektu byla ověřována virusneutralizačním testem.

VÝSLEDKY

CHEMICKÝ ROZBOR VZORKŮ

Vzorek 1 z podroštových prostorů obsahoval v sušině (g . kg⁻¹): 109,3 dusíkatých látek, 14,0 tuku, 276,0 vlákniny, 115,3 popela. Původní sušina byla 44,2 g . kg⁻¹.

Vzorky 2 a 3 z retenční nádrže I v průměru obsahovaly v sušině (g . kg⁻¹): 112,5 dusíkatých látek, 10,0 vlákniny, 15,0 popela. Původní sušina těchto vzorků byla 2,5 g . kg⁻¹.

Vzorek 4 z retenční nádrže II obsahoval v sušině (g . kg⁻¹): 112,5 dusíkatých látek, 7,8 tuku, 13,0 vlákniny, 71,0 popela. Původní sušina vzorku byla 25,3 g . kg⁻¹.

IZOLACE VIRU NA KRÁLÍCÍCH A JEHO PRŮKAZ (tab. I, II)

Po aplikaci infikovaného vzorku 1, inkubovaného 1, 2, 20, 44 a 72 hodiny při teplotě +15 °C, králíci uhynuli. Králíci infikovaní stejným vzorkem, ale inkubovaným 96 a 120 hodin, pokus přežili. Z mozků uhynulých králíků byl izolován virus ACH na buněčných kulturách kuřecích embryonálních buněk. Specifita cytopatického efektu byla potvrzena

I. Přežívání viru Aujeszkyho choroby v prasečí kejdě — Survival of Aujeszky's disease virus in pig slurry

Vzorek číslo	Druh kejdy	Teplota °C	pH	Infekční dávka viru PFU . ml ⁻¹	Doba přežití viru	Doba inaktivace
1	z podroštových prostor	15	6,5	10 ⁶	72 hodiny	96 hodin
2	zvodněná z retenční nádrže I	15	6,8	10 ⁵	23 dny	30 dnů
2	zvodněná z retenční nádrže I	4	6,8	10 ⁵	23 dny	30 dnů
3	zvodněná z retenční nádrže I	4	7,0	10 ⁴	16 dnů	23 dny
3	zvodněná z retenční nádrže I	4	8,0	10 ⁴	16 dnů	23 dny
4	zvodněná z retenční nádrže II	4	7,0	10 ⁴	16 dnů	23 dny

II. Průkaz viru Aujeszkyho choroby na králících po aplikaci infikované prasečí kejdy ze vzorku 2 — Detection of the Aujeszky's disease virus on rabbits after the application of infected pig slurry from sample 2

Druh kejdy	Teplota °C	pH	Infekční dávka viru PFU.ml ⁻¹	Pokusný králík	Dny po infekci kejdy						
					1	5	9	16	23	30	37
Zvodněná z retenční nádrže I	15	6,8	10 ⁵	1. králík	+	+	+	+	+	—	—
				2. králík	a	+	+	+	+	—	—
	4	6,8	10 ³	1. králík	+	+	+	+	+	—	—
				2. králík	a	a	a	a	a	—	—

— = králík přežil

+ = králík uhynul a virus byl izolován z mozku a prodloužené míchy na buněčných kulturách

a = králík uhynul a virus se nepodařilo izolovat z mozku a prodloužené míchy na buněčných kulturách

virusneutralizačním testem. Virus ACH tedy v infekční dávce 10⁶PFU .ml⁻¹ kejdy přežíval 72 hodiny při teplotě +15 °C a při pH 6,5, ale byl inaktivován za stejných podmínek za 96 hodin.

U vzorku 2 uhynuli všichni králíci infikovaní kejdou z retenční nádrže I od 1. do 23. dne po její arteficiální infekci. Králíci infikovaní stejnou kejdou, ale inkubovanou s virem 30 a 37 dnů, pokus přežili. Při vyšetřování tohoto vzorku se u některých uhynulých králíků nepodařilo izolovat virus z mozku na buněčných kulturách RK 13, a proto byla v pokusech v dalších dvou vzorcích (vzorek 3 a 4) odebírána také bederní mícha. Specifita cytopatického efektu byla prokázána virusneutralizačním testem. Při infekční dávce 10⁵PFU na mililitr kejdy přežíval tedy virus 23 dny při teplotě +15 °C a při teplotě +4 °C a pH 6,8, ale nikoliv 30 dnů za stejných podmínek.

Po infekci králíků vzorky 3 a 4 uhynuli všichni králíci po aplikaci kejdy z retenční nádrže I a II od 3. do 16. dne po její arteficiální infekci. Králíci infikovaní stejnou kejdou, ale inkubovanou s virem 23 a 30 dnů, pokus přežili. V suspenzi mozku a míchy všech uhynulých králíků byl virus prokázán kultivací na buněčných kulturách RK 13 a specifita byla potvrzena virusneutralizačním testem. Virus tedy v infekční dávce 10⁴PFU na mililitr přežíval v kejdě 16 dnů při teplotě +4 °C a při pH 7,0, ale nikoliv 23 dny za stejných podmínek. Stejných výsledků bylo dosaženo při zvýšení pH kejdy z retenční nádrže II na pH 8,0.

DISKUSE

Naše výsledky získané s kejdou z podroštových prostor, ve kterých se dá předpokládat dost silná koncentrace moče a výkalů, ukazují, že se virus i při jeho vysoké koncentraci 10⁶PFU na mililitr kejdy poměrně rychle inaktivuje (tj. za 96 hodin po arteficiální infekci). Je to v soulase i s údaji, které uveřejnili Thawley aj. (1982) s odkazem na disertační práci Freundovu (1981). V této práci se uvádí, že virus ACH v materiálu kontaminovaném trusem a močí přežije jen několik hodin a v odpadních jímkách méně než 48 hodin. Je nutné vzít v úvahu,

že v našem pokuse bylo použito značně vysoké koncentrace viru, která se v přirozených podmínkách nikdy nemůže vyskytnout. Na rozdíl od výsledků uvedených autorů a od našich výsledků zjistil Kretzschmar (1970) v prasečí moči, v arteficiálně připravené prasečí močůvce a trusu značně dlouhé přežívání viru, a to v extrémním případě v prasečím trusu při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$ až 93 dny. Pro tyto rozdílné výsledky je velice obtížné najít spolehlivé vysvětlení. Jedno z možných vysvětlení se však nabízí ve vysoké koncentraci viru při arteficiální infekci v pokusech Kretzschmarových (1970). Tato koncentrace se většinou pohybovala v rozmezí 10^6 až 10^7 TCID₅₀/0,1 ml. Dále přichází v úvahu i druh exkrementů, ovlivněný krmivem, a vlastnosti použitého virového kmene. Ostatní naše výsledky získané s přežíváním viru v retenčních nádržích, tj. v technologicky upravené prasečí kejďě, nemohou být konfrontovány s údaji v literatuře, protože tyto údaje chybějí. V pokusech jsme vycházeli z údajů o vhodném prostředí viru pro jeho udržování v podmínkách pH 6,0 až 8,0 při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$. Teplota $+4^{\circ}\text{C}$ je uváděna i při uchování viru z tkáňových kultur v běžných laboratorních podmínkách jako vyhovující, protože virus zde ztrácí infekční titr velmi pomalu (Sabó, 1981). Rovněž pH 7,0 až 8,0 podstatně neovlivňuje přežívání viru. Předpokládáme, že i nejnižší koncentrace viru, kterou jsme zvolili pro infekci kejdy z retenčních nádrží, je dostatečná a že se v provozních podmínkách nemůže nikdy vyskytnout. Proto také doba potřebná pro inaktivaci viru — 23 dny — je bezpečná a měla by být dodržena před použitím ke hnojení. Inaktivace viru v podroštových prostorech je rychlejší i při vysoké koncentraci viru, ale z hlediska provozu ve velkovýrobní technologii není využitelná. Kejda v podroštových prostorách dlouho nezůstává, ale postupuje další cestou až do retenčních nádrží. Využití samovolné inaktivace viru v retenčních nádržích odbourává použití jakýchkoliv dezinfekčních prostředků, jejichž aplikace by byla neúměrně nákladná a navíc by negativně zasahovala do životního prostředí.

Literatura

ČSN 46 7007. Výživná hodnota krmiv. 1967.

DAVIES, E. B. — BERAN, G. W.: Influence of environmental factors upon the survival of Aujeszky's disease virus. Res. veter. Sci., 31, 1981, s. 32-36.

FREUND, J. D.: The effects of environmental fomites on the survival of pseudorabies virus. [MSc. thesis.] ISU, Ames, Iowa 1981. 82 s.

KRETZSCHMAR, C. K.: Die Aujeszky'sche Krankheit. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag 1970. 256 s.

SABÓ, A.: Aujeszkyého choroba. 1. vyd. Bratislava, Veda 1981. 269 s.

SOLOMKIN, P. S. — TUTUŠIN, M. I.: Dlitelnost sochranenija virusa bolezni Aujeszki v kormach i na predmetach uchoda za životnymi. Veterinarija (Moskva), 33, 1956, s. 49-50.

THAWLEY, D. G. — GUSTAFSON, D. P. — BERAN, G. W.: Procedures for the elimination of pseudorabies virus from herds of swine. J. amer. Veter.-Med. Assoc., 181, 1982, s. 1513-1518.

USTENKO, V. S.: Vyživajemost virusa bolezni Aujeszki. Veterinarija (Moskva), 34, 1957, s. 74-75.

WOOLEY, R. E. — GILBERT, J. P. — WHITEHEAD, W. K. — SHOTTS, E. B. — DOBBINS, C. N.: Survival of viruses in fermented edible waste material. Amer. J. veter. Res., 42, 1981, s. 87-90.

Došlo dne 8. 10. 1984

ШМИД, Б. — ВАЛИЧЕК, Л. — РОДАК, Л. — ЮРАК, Е. — ГЕРЦИГ, И. — ДВОРЖАЧЕК, Л. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно; Районное ветеринарное управление, Лоуны): **Выживание вируса болезни Ауески (БА) с инфицированной свиной кейды.** Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 419-424.

Как доказано, вирус болезни Ауески (БА) после экспериментального заражения свиной кейды из подрешеточных мест в инфекционной дозе 10^6 PFU .мл⁻¹ вызывает при 15 °C и при pH 6,5 в течение 72 час., но инактивируется через 96 час. В технологически упорядоченной разбавленной кейде из отстойников после экспериментальной инфекции дозой вируса БА 10^5 PFU .мл⁻¹ вирус выживал при +15 °C и +4 °C, при pH 6,8 в течение 23 дней, но инактивировался в тех же условиях через 30 дней. При понижении этой дозы до 10^4 PFU .мл⁻¹ при +4 °C и pH 7,0 и 8,0 вирус выживал 16 дней, инактивировался через 23 дня после заражения.

вирус болезни Ауески; выживание вируса; свиная кейда; промышленная технология

ŠMÍD, B. — VALÍČEK, L. — RODÁK, L. — JURÁK, E. — HERZIG, I. — DVOŘÁČEK, L. (Veterinary Research Institute, Brno; District Veterinary Station, Louny): **The Survival of the Aujeszky's Disease Virus (ADV) in Infected Pig Slurry.** Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 419-424.

It has been demonstrated that after experimental infection of pig slurry from the space under the slatted floor (infection dose of 10^6 PFU per ml), the Aujeszky's disease virus (ADV) survived for 72 hours at the temperature of 15 °C and at pH 6.5, but was inactivated after 96 hours. When technologically treated pig slurry from the storage tanks was saturated with water and infected with ADV at the dose of 10^5 PFU per ml, the virus survived for 23 days when kept at 15 °C and 4 °C and at pH 6.8, but was inactivated under the same conditions after 30 days. When the infective ADV dose in the technologically treated pig slurry in the storage tanks was reduced to 10^4 PFU per ml, the virus survived 16 days at +4 °C and pH 7.0 and 8.0 but was inactivated within 23 days after infection.

Aujeszky's disease virus; virus survival; pig slurry; large-scale production technology

ŠMÍD, B. — VALÍČEK, L. — RODÁK, L. — JURÁK, E. — HERZIG, I. — DVOŘÁČEK, L. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno; Kreis-Veterinäreinrichtung, Louny): **Überlebensfähigkeit von Viren der Aujeszky'schen Krankheit (ACH) in infizierter Schweinegülle.** Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 419-424.

Es wurde nachgewiesen, daß das Virus der Aujeszky'schen Krankheit (ACH) nach einer experimentellen Infektion der aus dem Raum unterhalb des Gitterrostes anfallenden Schweinegülle durch eine Infektionsdosis von 10^6 PFU .мл⁻¹ bei einer Temperatur von 15 °C und beim pH-Wert 6,5 auf die Dauer von 72 Stunden überlebt, sich jedoch nach 96 Stunden inaktiviert. In einer technologisch mit Wasserzusatz aufbereiteten Schweinegülle aus Retentionsbehältern überlebte das Virus nach experimenteller Infektion durch eine ACH-Virusdosis von 10^5 PFU .мл⁻¹ bei Temperaturen von +15 °C sowie +4 ° und pH + 6,8 auf die Dauer von 23 Tagen, unter denselben Bedingungen inaktivierte es sich jedoch nach 30 Tagen. Bei einer Senkung der Infektionsdosis des ACH-Virus in der technologisch aufbereiteten Schweinegülle aus den Retentionsbehältern auf 10^4 PFU .мл⁻¹ und bei +4 °C und pH = 7,0 und 8,0 überlebte das Virus 16 Tage, inaktivierte sich jedoch 23 Tage nach der Infektion.

Virus der Aujeszky'schen Krankheit; Überleben des Virus; Schweinegülle; industriemäßige Technologie

Adresy autorů:

MVDr. Bedřich Šmíd, CSc., MVDr. Lubomír Valíček, CSc., MVDr. Ladislav Rodák, CSc., doc. MVDr. Evžen Jurák, CSc., MVDr. Ivan Herzig, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

MVDr. Ladislav Dvořáček, Okresní veterinární zařízení, Poděbradova 877, 440 55 Louny

SROVNÁNÍ DIAGNOSTICKÝCH MOŽNOSTÍ PALPACE BŘÍŠNÍ DUTINY A UŠNÍ AKUPUNKTURY U ONEMOCNĚNÍ GASTROINTESTINÁLNÍHO TRAKTU U PSŮ

J. Štill, J. Konrád

ŠTILL, J. — KONRÁD, J. (Vysoká škola veterinární, Brno): *Srovnání diagnostických možností palpce břišní dutiny a ušní akupunktury u onemocnění gastrointestinálního traktu u psů*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 425-431.

Práce se zabývá porovnávací studií diagnostických možností využití palpce a aurikulodiagnostiky u 89 a 78 psů s klinickými projevy *gastritis acuta*, *gastroenteritis acuta*, *gastroenteritis acuta haemorrhagica*. Statistické vyhodnocení dosažených výsledků potvrdilo významný rozdíl v diagnostické úspěšnosti ve prospěch aurikulodiagnostiky. Nejvýznamnějších výsledků bylo dosaženo při posuzování *gastritis acuta*, při němž aurikulodiagnostika vykazovala 100% úspěšnost proti 33,3% u palpačního vyšetření. Objektivita detekce bolestivosti a pokles hodnoty relativního kožního odporu v příslušném aktivním bodu byly dány použitím atraumatické odpružené elektrody. Dosažené výsledky, které jsou ve veterinární medicíně prioritní, jsou v souladu s obdobnými poznatky v humánní klinické akupunktuře.

pes; klinická propedeutika; akupunktura; diagnostika; vnitřní nemoci

Při klinickém vyšetřování orgánů dutiny břišní u psů používáme kromě dalších postupů běžně i palpaci, která nám poskytuje užitečné informace o možných probíhajících patologických procesech. Podle Hansena a Schliaka (1962) můžeme při této palpaci rozlišit tři druhy bolesti:

1. **přímoú bolest** — zahrnuje palpační bolestivost patologicky pozměněného orgánu (například zaníceného úseku střeva),
2. **nepřímoú bolest** — vzniká rozšířením primární bolestivosti z ložiska na peritoneum,
3. **přenesenou bolest** — reflexní přenos bolestivosti na jinou část těla, která má stejnou segmentální inervaci jako orgán [zóny podle Head a Mackenzieho].

Různá projekce palpační bolestivosti při zánětlivých procesech v dutině břišní do jisté míry znesnadňuje správnou interpretaci pozitivního nálezu. Proto dnes chápeme palpační vyšetřovací metodu jako doplňkovou, která však po celkovém zhodnocení v kontextu dalších vyšetření pomáhá stanovit diagnózu probíhajícího patologického procesu.

V posledních letech se v odborné literatuře stále častěji setkáváme s klinickými a experimentálními údaji o diagnostickém využití kožně-svalových bodů k diagnostice některých vnitřních onemocnění. Tak například Kothbauer (1982) uvádí celou řadu diagnostických, tlakově citlivých bodů na těle skotu a koní, které mají vztah k probíhajícím

cím patologickým procesům orgánů dutiny pánevní, břišní a hrudní. Některé z nich byly potvrzeny experimentálně (K o t h b a u e r, 1966). Brunner (1978) popisuje obdobné body pro psa. Uvedené body se vyskytují převážně v kožních a svalových segmentech odpovídajících inervaci příslušného vnitřního orgánu (nebo v sousedních segmentech), jsou tedy lokalizovány v příslušné Headově a Mackenzieho zóně. Při zpětném porovnání těchto bodů s nákresy tzv. akupunkturálních bodů zjistil autor nápadnou shodu. Učebnice humánní (V o g r a l i k a V o g r a l i k, 1978 a jiní) a veterinární akupunktury (K u n g a K l i d e, 1977; Brunner, 1980) však popisují i jiné body, které mají mít diagnostický a léčebný význam při chorobách vnitřních orgánů. Tyto body velmi často nemají zřetelný segmentální vztah k příslušným orgánům. Jak však ukazují různé klinické i experimentální studie (např. V o g r a l i k a V o g r a l i k, 1978 a jiní), je možné těchto vybraných bodů skutečně s úspěchem využít jak k diagnostice, tak i k léčbě některých vnitřních onemocnění.

V posledních několika desetiletích se v klinické praxi převážně humánní akupunktury využívá diagnosticky a léčebně tzv. ušní akupunktury (K r o p e j, 1977 a další). Princip této zajímavé metody není dosud jednoznačně vědecky objasněn, klinický projev (K ö n i g, 1975) i experimentální výsledky (A n o n., 1979; Š t i l l, 1984) však svědčí pro neurální mechanismus.

V předchozích studiích jsme klinicky i experimentálně (Š t i l l a K o n r á d, 1985; Š t i l l, 1985) ověřili existenci elektricky detekovatelných a tlakově citlivých bodů na ušním boltci psů. Body se zde vyskytovaly místně specificky při mnoha onemocněních lokalizovaných v dutině pánevní, břišní, hrudní a na kůži. V klinické studii jsme zde zjistili u 295 psů pozitivní nález na korespondujícím ušním bodu v 85,8 % u akutních zánětlivých onemocnění. U těchto onemocnění byly tedy tyto body diagnosticky významné.

Cílem tohoto příspěvku je porovnat na příkladu tří akutních onemocnění gastrointestinálního traktu jejich diagnostickou průkaznost pomocí tradičně používané palpce dutiny břišní na jedné straně a detekci příslušných ušních bodů (aurikulodiagnostiky) na straně druhé.

MATERIÁL A METODA

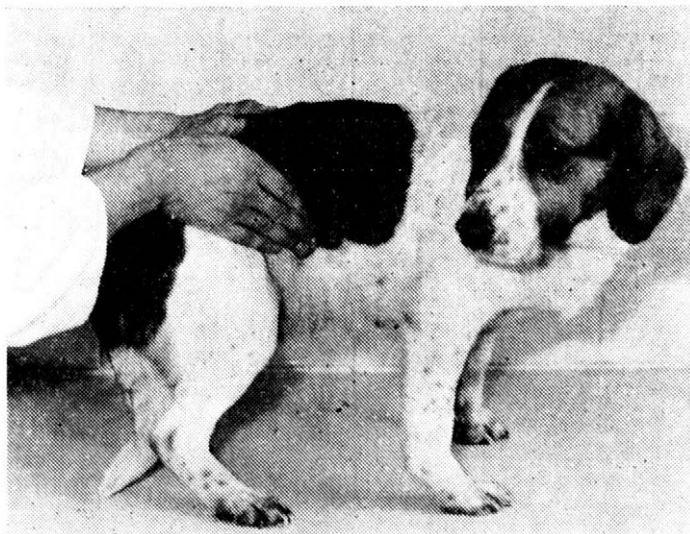
K hodnocení palpační citlivosti (obr. 1) jsme použili 89 psů (45 psů, 44 feny) osmi plemen, vykazujících příznaky *gastritis acuta*, *gastroenteritis acuta* a *gastroenteritis acuta haemorrhagica*. Obdobně k aurikulodiagnostickému hodnocení (obr. 2) jsme použili 78 psů (35 psů, 43 feny) šesti plemen se stejnými onemocněními (tab. I).

Aurikulodiagnostické vyšetření vnitřní strany ušního boltce psů jsme dělali stejně jako v předchozích citovaných experimentálních a klinických pracích, tedy za pomoci přístroje Akudias I československé výroby, který je určen k detekci míst se sníženým kožním odporem. Abychom zajistili potřebnou objektivitu aurikulodiagnostického vyšetření, použili jsme i zde k detekci atraumatickou odpruženou elektrodu o detekčním tlaku 80 až 120 g/mm², tj. 8156 až 12 232 Pa.

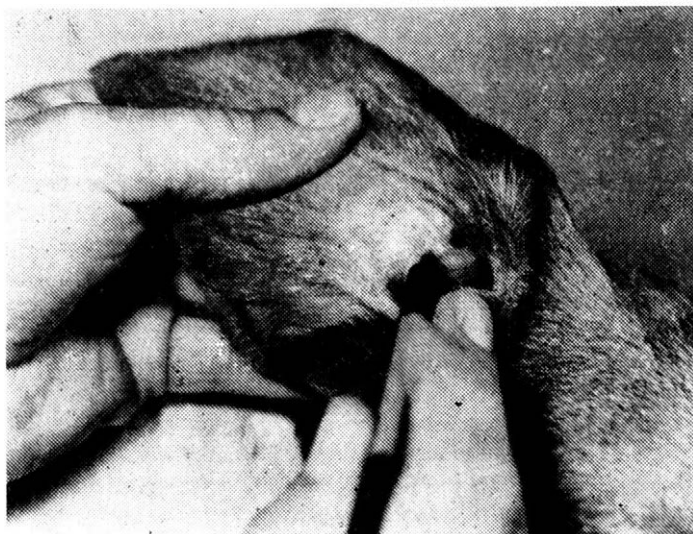
Při detekci jsme hrotem detekční elektrody postupně otestovali celý vnitřní povrch ušního boltce — nález aktivního ušního bodu se projevil poklesem kožního odporu a náhlou reflexní reakcí zvířete, charakterizovanou prudkým záškubem těla, někdy i vyštěknutím.

Pro objektivnost vyšetření byly z obou souborů vyloučeni pacienti (tři, resp. dva), kteří reagovali celkově ustrašeně a nervózně na jakoukoliv manipulaci.

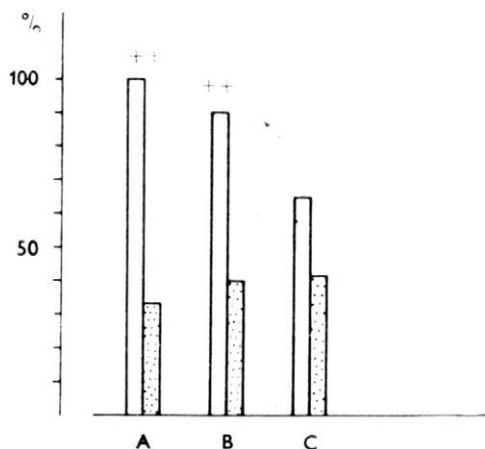
1. Palpace dutiny břišní psa — Palpation of the abdominal cavity of a dog



2. Detekce aktivních ušních bodů psa — Detection of the active ear points of a dog



3. Srovnání pozitivního aurikulodiagnostického a palpačního nálezu u psů — A comparison of the positive auriculodiagnostic and palpation findings in dogs
 [] aurikulodiagnostika; [] palpace dutiny břišní; A — *gastritis acuta*; B — *gastroenteritis acuta*; C — *gastroenteritis acuta haemorrhagica*
 ++ $P < 0,01$



I. Porovnávací výsledky diagnostické úspěšnosti palpce a aurikulodiagnostiky u vybraných onemocnění gastrointestinálního traktu — A comparison of the results of the diagnostic success of palpation and auriculodiagnosis in the selected diseases of the gastrointestinal tract

Klinická diagnóza	Aurikulodiagnostika			Palpce břišní dutiny		
	počet psů	pozitivní nález v příslušném ušním bodu		počet psů	pozitivní palpační bolestivost	
		počet psů	procent		počet psů	procent
<i>Gastritis acuta</i>	21	21	100,0	27	9	33,3
<i>Gastroenteritis acuta</i>	40	36	90,0	50	20	40,0
<i>Gastroenteritis acuta haemorrhagica</i>	17	11	64,8	12	5	41,7

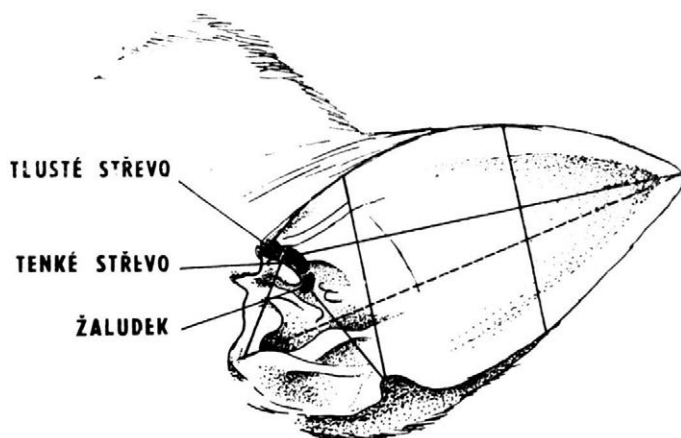
VÝSLEDKY

Tab. I zaznamenává výsledky úspěšné aurikulodiagnostické detekce a pozitivní palpační citlivosti dutiny břišní u sledovaných psů.

Grafické vyjádření výsledků zachycuje obr. 3.

Pozitivní palpační nález byl charakterizován podle typu a rozsahu patologického procesu ojediněle místně specifickou bolestivostí (např. zaníceného úseku střeva), nejčastěji difúzní bolestivostí v epigastriu při *gastritis acuta* nebo v celém břiše při *gastroenteritis acuta* a *gastroenteritis acuta haemorrhagica*. Zvláště v případě akutní gastritidy jsme zjišťovali zvýšený odpor svalů břicha (hlavně *m. rectus abdominis*) vůči palpaci. Pozitivní nález palpační bolestivosti se projevoval různě rychlou a různě intenzívní reakcí zvířete, zahrnující bolestivé vyštěknutí, stažení svalů břišního lisu, vyhrbení zad; zvíře se snažilo vymanit se z tlaku ruky.

Pozitivní aurikulodiagnostický nález v odpovídajícím ušním bodě (obr. 4) se projevil prudkým záškubem hlavy a těla, někdy doprovázeným bolestivým vyštěknutím.



4. Lokalizace aktivních ušních bodů pro zažívací aparát psa — Localization of the active ear points for the digestive tract of a dog

Statistické šetření pomocí χ^2 potvrdilo v diagnózách *gastritis acuta* a *gastroenteritis acuta* statisticky významný rozdíl (na hladině významnosti $P < 0,01$) v diagnostické úspěšnosti při použití uvedených dvou metod.

DISKUSE

Předložené výsledky (tab. I, obr. 3) svědčí o tom, že diagnostické potvrzení onemocnění aurikulodiagnostikou je při *gastritis acuta* a *gastroenteritis acuta* statisticky významně vyšší než palpací dutiny břišní.

V souladu s citovanou literaturou (Hansen a Schliak, 1962) můžeme konstatovat, že při palpaci dutiny břišní se setkáváme s různorodým nálezem. Přímo bolest detekujeme v daných nosologických jednotkách poměrně zřídka, častěji jsme se setkali s difúzní bolestivostí, která je buď projevem nepřímé a přenesené bolesti, nebo nasvědčuje zánětlivému poškození většího úseku trávicího traktu. Pouze z převažující lokalizace směrem kaudálním či kraniálním můžeme usuzovat na poškození příslušných úseků trávicího traktu. Častým nálezem je kontrakce břišních svalů při palpaci. Může jít jednak o projev tzv. Mackenzieho zón (viscerosomatický reflex — Šalanský, 1956), jednak o projev strachu z palpace.

Palpace dutiny břišní nám u sledovaných onemocnění podává cenné informace využitelné k stanovení diagnózy. Zároveň však, jak vidíme ze získaných výsledků (tab. I) i jak potvrzuje Niemand (1980), není palpace pozitivní u všech zvířat vykazujících příznaky onemocnění. Navíc difúzní bolestivost mnohdy znemožňuje bližší lokalizaci patologického procesu a diferenciální diagnostiku v břišní dutině.

V případě použití aurikulodiagnostiky jsme překvapivě našli výrazně vyšší pozitivní korelaci mezi klinickým projevem onemocnění a nálezem pozitivně reagujícího příslušného bodu na uchu pacienta. Stejně jako při této diagnostice u dalších nosologických jednotek (Štill a Konrád, 1985) jsme byli schopni odlišit typickou detekční bolestivost a pokles hodnoty relativního kožního odporu v příslušném aktivním bodu. Objektivita vyšetření přitom byla zajištěna použitím atraumatické odpružené elektrody a předchozím otestováním detekční citlivosti na většině povrchu boltce.

Výsledky dosažené v aurikulodiagnostice jsou v souladu s údaji z příslušné humánní literatury (Kropej, 1977), srovnatelné údaje platné pro veterinární oblast dosud chybí.

Na rozdíl od Headových a Mackenzieho zón není dosud plně objasněn mechanismus vzniku ušních aktivních bodů. V prvním případě segmentálně uspořádaných zón jde zjevně o vývojovou souvislost příslušného enterotomu myotomu, dermatomu, sklerotomu, neuritomu apod. Příslušné diagnosticky a terapeuticky využitelné zóny se zde vytvářejí prostřednictvím segmentálních míšních reflexů, přičemž se uplatňují i mezi-segmentální vztahy. V těchto souvislostech je možné vysvětlit také existenci mnoha tzv. akupunkturálních bodů, které se vyskytují v daných zónách či blízko nich (Brunner, 1978) a které se převážně shodují s kožně-svalovými body, popisovanými Kothbauerem (1982).

Jak ukazují některé studie (Anon., 1979; Štill, 1985), uplatňuje se v případě ušní akupunktury rozhodující měrou rovněž nervový systém,

přičemž se zde musí uplatňovat složitější nervový oblouk než v případě zón podle Heada a Mackenzieho. Výzkumy na tomto poli svědčí pro skutečnost, že jde o polysynaptický nervový oblouk fungující za účasti mozkových center, jako je retikulární formace a jádro nervu trojhlavého [Vogralik a Vogralik, 1978].

Po patřičném zácvičení osob vykonávajících aurikulodiagnostiku je možné — vzhledem k vysokému procentu záchytu pozitivních reagentů touto metodou — doporučit tento postup k praktickému využívání na klinických veterinárních pracovištích jako doplňkovou diagnostickou metodu vybraných nosologických jednotek.

Literatura

- ANONYM: Adrenergic nerve fibres — the chief factor affecting the changes of electric resistance of the rabbit pinna in experimental peptic ulcer. *Advances in acupuncture and acupuncture anaesthesia*. Beijing, Tiantan Xili 1979, s. 25-26.
- BRUNNER, F.: Akupunktur bei Kleintieren. *Wien. tierärztl. Mschr.*, 65, 1978, s. 334-349.
- BRUNNER, F.: Akupunktur für Tierärzte — Akupunktur der Kleintiere. Schorn-dorf, WBV Biologisch-Medizinische Verlagsgesellschaft 1980, s. 19-145.
- HANSEN, K. — SCHLIAK, H.: Segmentale Innervation, ihre Bedeutung für Klinik und Praxis. Stuttgart, G. Thieme 1962.
- KÖNIG, G.: Theoretische Grundlage der Ohrakupunktur. *Akupunktur — Theorie und Praxis*, 3, 1975, s. 180-184.
- KOTHBAUER, O.: Die Provokation einer hyperalgetischen Zone der Haut und eines „Schmerzpunktes“ durch Reizung eines Uterushornes beim Rind. *Wien. tierärztl. Mschr.*, 53, 1966, s. 803-812.
- KOTHBAUER, O.: Diagnostic acupuncture points on the horse. *Proc. 8 a. int. veter. acupunct. Conf. veter. Acupunct.*, Fort Mitchell, 1982, s. 221-228.
- KROPEJ, H.: Systematik der Ohrakupunktur. 3. Aufl. Heidelberg, Karl F. Haug 1977, s. 5-15.
- KUNG, S. H. — KLIDE, A. M.: Veterinary acupuncture. University of Pennsylvania Press, 1977, s. 67-119.
- NIEMAND, H. G.: Praktikum der Hundeklinik. 4. Aufl. Berlin, Hamburg, Paul Parey 1980, s. 352.
- ŠALANSKÝ, I.: Kožně-elektrometrické zjišťování vegetativního tonu se zvláštním zřetelem k Headových zónám. [Kandidátská disertační práce.] Brno, 1956. — Lékařská fakulta UJEP.
- ŠTILL, J.: Contribution to elucidation of neural mechanism of ear-acupuncture action in the dog. *Acta veter. (Brno)*, 1985, v tisku.
- ŠTILL, J. — KONRAD, J.: Anwendungsmöglichkeiten der Ohrakupunktur in der Diagnostik der inneren und Hauterkrankungen beim Hund. *Kleintierpraxis*, 1985, v tisku.
- VOGRALIK, V. G. — VOGRALIK, M. V.: Iglorefleksoterapija. Gorkij, Volgo-Vjatskoje Izd. 1978, s. 246-273.

Došlo dne 12. 7. 1984

ШТИЛЛ, Я. — КОНРАД, Я. (Институт ветеринарии, Брно): Сравнение диагностических возможностей пальпации брюшной полости и ушной акупунктуры при заболеваниях желудочно-кишечного тракта собак. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985 (7): 425-431.

В работе сравниваются эти два способа у 89 и 78 собак с клиническими проявлениями *gastritis acuta*, *gastroenteritis acuta*, *gastroenteritis acuta haemorrhagica*. Статистическая оценка результатов подтвердила значительную разницу диагностического успеха в пользу аурикулодиагностики. Самые значительные результаты получены в оценке *gastritis*

acuta, где аурикулодиагностика показывает 100 % успешность против 33,3 % у пальпации. Объективность детекционной болезненности и понижение относительного кожного сопротивления в данной активной точке даны примененным атравмическим электродом. Полученные результаты, которые приоритетны в ветеринарии, соответствуют аналогичным данным в гуманитарной клинической акупунктуре.

собака; клиническая пропедевтика; акупунктура; диагностика; внутренние болезни

STILL, J. — KONRÁD, J. (University of Veterinary Medicine, Brno): *A Comparison of the Diagnostic Possibilities of Abdominal Cavity Palpation and Ear Acupuncture in Dogs Suffering from Disorders in the Gastrointestinal Tract*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 425-431.

The diagnostic possibilities of the use of palpation and auriculodiagnosis were compared in 89 and 78 dogs with clinical signs of *gastritis acuta*, *gastroenteritis acuta*, and *gastroenteritis acuta haemorrhagica*. A significant difference in the success of diagnosis in favour of auriculodiagnosis was confirmed by the statistical evaluation of the results. The best results were obtained when *gastritis acuta* was diagnosed: auriculodiagnosis was successful in 100 % of the cases, in contrast to palpation which was successful in 33.3 % of the cases. The objectivity of detection painfulness and the decrease of relative skin resistance were secured by the use of an atraumatic electrode. The results which are of primary importance in veterinary medicine agree with similar findings in human clinical acupuncture.

dog; clinical propedeutics; acupuncture; diagnosis; internal diseases

STILL, J. — KONRÁD, J. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): *Vergleich der diagnostischen Möglichkeiten von Palpation der Bauchhöhle und Akupunktur der Ohren bei Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes bei Hunden*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 425-431.

Die Arbeit bringt eine vergleichende Studie der diagnostischen Möglichkeiten der Anwendung von Palpation und Aurikulodiagnostik bei 89 bzw. 78 Hunden mit klinischen Symptomen der *Gastritis acuta*, *Gastroenteritis acuta* und *Gastroenteritis acuta haemorrhagica*. Die statistische Auswertung der ermittelten Ergebnisse bestätigte einen bedeutenden Unterschied der diagnostischen Erfolgsrate zugunsten der Aurikulodiagnostik. Die bedeutsamsten Ergebnisse wurden bei der Beurteilung der *Gastritis acuta* erzielt, wo die Aurikulodiagnostik einen 100 %igen Erfolg gegenüber den 33,3 % bei der Palpation aufwies. Die Objektivität der Detektionsschmerzhaftigkeit und die Senkung des Wertes des relativen Hautwiderstands im entsprechenden aktiven Punkt wurden durch Anwendung einer atraumatischen abgefederten Elektrode erzielt. Die Ergebnisse, die in der Veterinärmedizin von Priorität sind, stehen im Einklang mit analogischen Erkenntnissen in der klinischen humanen Akupunktur.

Hund; klinische Propedeutik; Akupunktur; Diagnostik; innere Krankheiten

Adresa autorů:

MVDr. Jan Still, prof. MVDr. Jaroslav Konrád, DrSc., 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, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Půjčovní doba: pondělí, úterý a čtvrtek od 9.00 do 16.30 hodin, středa od 9.00 do 18.00 hodin, pátek od 9.00 do 15.30 hodin. U každé žádané publikace uveďte signaturu.

RIVES, M. J.

D 38.168/1983/87

Dermatologie equine: Donnees bibliographiques recentes.

Toulouse, École nationale vétérinaire 1983. 70 s., tab. (Kůň — nemoci kožní — ochrana a léčení — výzkum — Francie — disertace)

BITTNER, G.

E 27.987/128

Ein Beitrag zur Epizootologie der Strongylideninfektion des Pferdes in einem bayerischen Gestütsareal. Inaug.-Diss. d. Tierärztl. Fak. d. Ludwigs-Maxim.-Univ. München.

München, Inst. f. vergl. Tropenmedizin 1983. 68 s., 9 obr., 9 tab. (Kůň — cizopasnici — měchovci — výskyt — NSR — Bavorsko — výzkum — disertace)

BARNEVELD, A.

D 51.973/149

Spat bij het paard. — Equine bone spavin. Proefschrift d. Rijksuniversiteit te Utrecht.

Utrecht, n. vl. 1983. 178 s., obr., fot., tab., res. hol., angl. (Kůň — nemoci — tarsus — výzkum — metody — Holandsko)

D 75.283

Biotin in ruminant nutrition. Proceedings of the Roche vitamin symposium, London, November 11, 1982.

Basel, ROCHE 1983. 26 s., obr., tab. (Přežvýkavci — výživa — biotin — výzkum — Anglie)

JENTSCH, D. — SCHROEDER, G.

E 38.142/378

Empfehlungen zur Tierhygiene in der Rinderproduktion.

Markkleeberg, AdL 1983. 80 s., 19 tab. (Veterinární hygiena — skot — chov)

D 72.967/177

Acid-base parameters in venous blood of pregnant and non-pregnant Dutch Friesian and Dutch red and white cows.

Zeist, Netherlands, Res. inst. for animal husbandry "Schoonoord" 1982. S. 189-191. tab. Repr. f. Res. inst. for animal husbandry "Schoonoord" The veterinary quarterly. Vol. 4, No. 4, 1982. (Krávy — krev žilná — acidobazické parametry)

ÚČINNOST *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSENSIS* PROTI LARVÁM MUCHNIČEK V TERÉNNÍCH PODMÍNKÁCH JIŽNÍCH ČECH

J. Olejníček, V. Mařha, J. Weiser

OLEJNÍČEK, J. — MAŘHA, V. — WEISER, J. (Parazitologický ústav ČSAV; Entomologický ústav ČSAV, České Budějovice): Účinnost *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* proti larvám muchniček v terénních podmínkách jižních Čech. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 433-441.

Ve dvou regulovaných potocích v okrese České Budějovice jsme testovali účinnost suspenze sporů *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* proti larvám muchniček. Obě lokality tvořily drobné regulované potoky s lichoběžníkovým profilem, dlážděné, s různě hustou vegetací, s rychlostí proudu v rozmezí od 40 do 90 cm za sekundu. V obou případech bylo použito lyofilizovaných sporů z produkce Roger Bellon v konečné koncentraci 1×10^5 sporů na mililitr. Účinek sporů byl sledován jak na umělých a přírodních substrátech v terénu, tak i v laboratoři na larvách přinesených z jednotlivých kontrolních stanovišť. V obou případech byla ve sledovaných úsecích potoků zjištěna mortalita larev muchniček 90 až 100 %, a to jak u vzorků donesených do laboratoře, tak i na umělých substrátech. V oblasti dozrívající působnosti suspenze sporů bylo v populacích larev na lokalitě zjištěno vyšší procento larev posledního instaru, což lze ve shodě s jinými autory vysvětlovat vyšší vnímavostí mladších larev k preparátu. Výsledky testů ukázaly, že *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* je vhodným přípravkem k hubení střeoevropských druhů muchniček, zejména při přemnožení některých druhů, významných z veterinárního hlediska, v upravovaných tocích.

Simuliidae; *Bacillus thuringiensis* H-14; regulované toky

Nutnost omezovat populace druhů muchniček působících vážné hospodářské a zdravotnické ztráty na jedné straně a stále naléhavější potřeba zachovat čistotu životního prostředí na straně druhé nás nutí uvádět do praxe přípravky, které by vyhovovaly oběma těmto potřebám. Jedním z nejslibnějších prostředků v boji s larvami komárů a muchniček je dnes *Bacillus thuringiensis* sérovar H-14. Jeho široké uplatnění souvisí s úsilím výzkumných pracovníků ve Zvláštním programu pro výzkum a výuku boje s tropickými nemocemi UNDP (World Bank) WHO. Továrně vyráběné formulace a zkušenosti s nimi jsou většinou vázány na tropické podmínky, kde v určitých situacích (vznik rezistence proti chemickým insekticidům) je *B. thuringiensis* H-14 (uváděný také jako var. *israelensis*) jediným prostředkem, proti kterému nemají potírané larvy odolnost. V Africe to platí zejména o larvách muchničky *Simulium damnosum complex* (vyhraněné antropofilní muchničky s velkou migrací), proti kterým jsou dnes používány suspenze bakterií ve velkém rozsahu (více než 6 000 000 l přípravku za rok). *S. damnosum* v Africe jako

přenašeč onchocerkóz je zcela zvláštním případem. Všude jinde se uplatňují větší skupiny různých druhů muchniček. Při masovém napadení člověka a domácích zvířat často převažuje jejich účinek jako trapičů s jedovatými slinami, vyvolávajícími otoky, nad eventuelním přenosem červových onemocnění. Ztráty u dobytka vyvolávané bodnutím muchniček jsou způsobeny především reakcí na toxin vstříkovaný se slinou před sáním. Výsledný účinek odpovídá anafylaktickému šoku. U středních poškození dochází k podráždění, slabě zvýšené teplotě, objeví se zrychlený měkký puls jako při horečce, obtížné dýchání, frkání a kašlání, někdy otevřená huba s pěnou a vyplazeným jazykem. Přitom se dostavuje snížení tělní teploty, nezájem o potravu, polehávání a během šesti až sedmi dní zlom — uzdravení nebo úhyn. Při těžkém napadení stojí dobytek rozkročen, má rozsáhlé otoky, široce otevřenou tlamu, s vystrašeným bučením se hroutí a hyne již první den. O významu muchniček referuje ve své učebnici poměrně podrobně Martini (1952). Z Evropy jsou známy každoroční ztráty na dobytku na pastvinách v dolním toku Dunaje (Baranov, 1938).

Zjištěné škody na dobytku mohou být obrovské: v Rumunsku jen v r. 1923 zašlo na uštípání muchničkami 1645 koní, 10 620 kusů skotu, 915 ovcí, 1460 koz a 2834 prasat. Z Jugoslávie uvádí Baranov (1939) za rok 1934: 311 koní a oslů, 3629 kusů skotu, 3588 ovcí, 3233 kozy a 1240 prasat. Podobně jsou známy záplavy muchniček v boreálních oblastech Evropy (např. z Německa jsou hlášeny úhyny skotu po pobodání muchničkami z oblasti řeky Eder) (Stäm aj., 1980) a Asie (typickým příkladem je povodí Angary na Sibiři). Z území ČSSR jsou hlášeny kalamitní výskyty muchniček, které měly ojediněle za následek až hromadný úhyn dobytka. Poměrně recentní případy jsou popsány z Tachovska a Českokrumlovka (podrobněji Minář a Kubec, 1968; Kubec a Minář, 1968). O veterinárním významu muchničkovitých v ČSSR referují Olejníček (1982a) a Jedlička (1982a). Údaje o průběžných ekonomických ztrátách působených muchničkami nejsou v žádném případě zanedbatelné. Jedlička (1982b) odhaduje, že na území Slovenska můžeme v současnosti předpokládat u pasených jalovic pokles přírůstku o 10 až 50 % během 50 až 100 dní, což znamená sníženou hmotnost jednoho kusu o 4 až 35 kg. V celoslovenském měřítku to představuje ročně 1300 až 12 600 tun nerealizované hmotnosti, což je ekvivalentní snížení stavu jalovic o 4200 až 42 000 kusů, resp. nevyužití 1500 až 14 000 ha pastvin a spotřebu jaderného krmiva navíc o 2500 až 25 000 tun. Snížená hmotnost jalovic v připouštěcím věku může znamenat jeho nežádoucí posun o 10 až 50 dní. Značná část toků protékajících pastvinami prošla nebo prochází různými melioračními úpravami, což, jak konstatují mnozí autoři (např. Rubcov, 1969; Kubec a Minář, 1968; Olejníček, 1982b), vede ke zlepšování životních podmínek především pro nežádoucí druhy muchniček.

O účinku *B. thuringiensis* H-14 na larvy muchniček poprvé referovali Undeen a Nagel (1978) a Weiser a Vaňková (1979). Těsně před tím zkoušeli Lacey a Mulla (1977) účinnost 13 „starých“ kmenů účinných na housenky a dosáhli částečné mortality u muchniček 64 až 88 % v laboratorních pokusech při 24hodinové expozici mikroba v koncentraci 10 ppm (10 mg/l). Účinek *B. thuringiensis* H-14 byl zatím několikrát úspěšně testován v laboratořích i v terénu, přede-

vším v tropických oblastech. Jedním z jeho mimořádných kladů je také téměř nulový účinek na necílové organismy (Guillet a Escaffre, 1979; Guillet a Barjac, 1979; Undeen a Colbo, 1980; Undeen a Berl, 1979; Undeen aj., 1981; Colbo a Undeen, 1980; Molloy aj., 1981; Molloy a Jamnback, 1981; Lacey a Federici, 1979; Olejníček aj. [v tisku]).

MATERIÁL A METODA

K testování byly vybrány dva regulované potoky v okrese České Budějovice. První z nich, Dubský potok, protéká poli v blízkosti obce Černý Dub, má regulované koryto dlážděné kameny, které je místy zaříznuté až dva metry pod úroveň terénu. Průměrná šířka koryta byla 1,5 m, průměrná hloubka vody 5 cm. Rychlost proudu byla měřena Raušerovou modifikací Pittotovy trubice a ve sledovaném úseku kolísala v rozmezí 70 až 90 cm/s, teplota vody, měření 28. 4. 1983 v 10 hodin, byla 11,4 °C. Koryto potoka bylo většinou jen řídce zarostlé různou vodní a bažinnou vegetací. Ve sledovaném úseku byly zjištěny druhy *Prosimulium tomosvaryi* Enderlein, 1921, *Eusimulium vernum* (Macquart, 1826) a *Odagmia ornata* (Meigen, 1818). Suspenze *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* byla aplikována v místech, kde potok vytéká z lesa, poblíž železniční stanice Černý Dub. Asi jeden a půl až dva kilometry od místa aplikace suspenze se potok vlévá do Černodubského rybníka.

Druhá ze sledovaných lokalit byl potok Rachačka, tekoucí v blízkosti severního okraje obce Purkarec. Potok má regulované koryto a protéká pastvinou. Průměrná šířka koryta je 1 m a hloubka 5 cm. Rychlost proudu kolísala v intervalu 40 až 60 cm/s, teplota vody 27. 7. 1983 ve 13 hodin byla 19,8 °C. Koryto potoka bylo místy hustě zarostlé trávou vyrůstající ve spárách dláždění a různou vodní vegetací. *B. t.* var. *israelensis* byl aplikován v místě ležícím 300 m proti proudu od ústí potoka do Vltavy. Ve sledovaném úseku byly zjištěny pouze larvy druhu *Odagmia ornata* (Meigen, 1818).

V obou případech po dobu terénních sledování nepršelo.

K testování bylo použito lyofilizovaných spor *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* z produkce Rogere Bellon, koncentrace 1×10^5 spor na mililitr, to znamená 6×10^9 spor v prvním experimentu (Dubský potok) a $2,5 \times 10^9$ spor ve druhém experimentu (potok Rachačka). Pro aplikaci bylo použito zahradní konve a suspenze spor byla lita do vody deset minut. Účinek *B. t. israelensis* byl kontrolován na šesti stanovištích (5 m proti proudu, 5, 50, 100, 200, 400 m po proudu od místa aplikace suspenze) v případě Dubského potoka a na pěti stanovištích (5 m proti proudu, 5, 50, 100, 300 m po proudu od místa aplikace suspenze) v případě potoka Rachačka. Na každém z kontrolních stanovišť byly umístěny vždy tři dny před aplikací suspenze neglazované bílé keramické kachle o rozměrech 10 × 10 cm a igelitové pentle o rozměrech 2,5 × 20 cm (Lewis a Bennett, 1974; Olejníček, 1980). Na těchto kachlích byly zjišťovány počty larev v terénu. Dále byly z každého stanoviště přineseny živé larvy, sebrané půl hodiny po aplikaci suspenze. Tyto larvy byly dále v laboratoři chovány v plexisklových nádobkách s 200 ml přefiltrované potoční vody při pokojové teplotě. Pohyb vody byl v nádobkách zajištěn vzduchováním kapilárou. Po dobu sledování nebyly larvy v laboratoři přikrmovány.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V obou experimentech byla ve sledovaných úsecích potoků zjištěná mortalita larev muchniček vyšší než 90 % — blížila se 100 %, a to jak u vzorků donesených do laboratoře, tak i na umělých substrátech v terénu (tab. I—V). I když u laboratorních testů je nutné odečíst v průměru 13% mortalitu způsobenou pro larvy muchniček stresujícími podmínkami v laboratorních chovech, je vysoká účinnost preparátu evidentní. Navíc, jak naznačuje zaznamenaná mortalita u kontrolního vzorku larev

I. Počty larev v přepočtu na 1 dm² substrátu na jednotlivých stanovištích Dubského potoka 24 hodiny před aplikací a 24 hodiny po aplikaci suspenze *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* — The numbers of larvae in conversion per 1 dm² of substrate at different sites of the Dubský brook 24 hours before the application and 24 hours after the application of the suspension of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Stanoviště	Kontrola – 5 m	+ 5 m	50 m	100 m	200 m	400 m
27. IV., 24 h před aplikací <i>B. t. i.</i>	6,0 E. v. 0,7 P. t.	22,3 E. v. 0,7 P. t. 1,2 O. o.	20,0 E. v. 1,0 P. t. 1,3 O. o.	5,8 E. v. 0,2 P. t.	18,2 E. v. 0,5 P. t.	9,8 E. v. 0,2 P. t. 0,2 O. o.
29. IV., 24 h po aplikaci <i>B. t. i.</i>	6,1 E. v. 0,2 P. t.	0,7 E. v.	0	0	0	0

E. v. = *Eusimulium vernum* (Macq.); P. t. = *Prosimulium tomosvaryi* End.; O. o. = *Odagmia ornata* (Meig)

z Dubského potoka, larvy různých druhů mohou být různě citlivé na transport, manipulaci a laboratorní podmínky. Rovněž tak je možné očekávat různou citlivost na *B. t. israelensis* u různých druhů muchniček. Materiál, se kterým jsme pracovali, je však malý na to, abychom se mohli vyjadřovat k těmto dvěma problémům, pro jejichž zodpovězení bude zapotřebí dalších experimentů.

V případě Dubského potoka byla 2. 5., tedy sedm dní po ošetření, provedena kontrola početnosti larev dále po proudu, v úseku, kde již nebyly umístěny umělé substráty. Až do vzdálenosti 500 m od místa aplikace suspenze nepřesahovala hustota larev na různých přírodních substrátech 0,1 larvy na dm². V místě vzdáleném 700 m od místa aplikace suspenze *B. t. i.* byla zjištěna hustota v průměru 8,3 larvy na dm² a ve vzdálenosti 1000 m 25,7 larvy na dm². Zejména poslední hodnota zhruba odpovídá maximální zjištěné hustotě larev v kontrolovaném

II. Mortalita kontrolních vzorků odebraných v terénu půl hodiny po aplikaci *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* na lokalitě Dubský potok. Každý vzorek obsahoval 100 náhodně vybraných živých larev (značení druhů jako v tab. I) — The mortality of the control samples taken in the field half an hour after the application of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* at the Dubský brook locality. Each sample contained 100 random-selected living larvae (species denoted like in Tab. I)

Kontrola 28. IV., 1/2 h po aplikaci <i>B. t. i.</i>	Kontrola		Ošetřená stanoviště				
	– 5 m	– 5 m	+ 5 m	50 m	100 m	200 m	400 m
Mortalita za 24 h (ks)	10 P. t. 2 E. v.	8 P. t. 4 E. v. 2 O. o.	21 P. t. 63 E. v. 15 O. o.	6 P. t. 75 E. v. 18 O. o.	100 E. v.	5 P. t. 86 E. v. 9 O. o.	2 P. t. 56 E. v. 42 O. o.
Mortalita za 24 h (%)	12	14	99	100	100	100	97
Živé larvy po 24 h	86 E. v. 2 O. o.	4 P. t. 82 E. v.	1 O. o.	—	—	—	3 O. o.

III. Počty larev *Odagmia ornata* na 1 dm² plochy na jednotlivých stanovištích potoka Rachačka — The numbers of the *Odagmia ornata* larvae per 1 dm² of area at the sampling sites of the Rachačka brook

Stanoviště	-5 m	+5 m	50 m	100 m	300 m
24 h před aplikací <i>B. t. i.</i>	1212	1562	482	28	160
24 h po aplikaci <i>B. t. i.</i>	1401	0	0	0	0,02

úseku před aplikací *B. t. i.* (tab. I). V daném případě je nutné vzít rovněž do úvahy fakt, že pro výskyt larev muchniček v potocích platí Poissonovo rozložení pravděpodobnosti, tzn., že existují úseky potoka, v nichž je abundance larev výrazně vyšší, a úseky — často jen několik metrů vzdálené — s místy výrazně řidčeji osídlenými larvami muchniček. Nerovnoměrnost výskytu uvádějí i Undeen aj. (1981), Undeen a Colbo (1980), Molloy a Jamnback (1981) a mnoho dalších autorů. Rovněž tak v našem případě se počty larev na jednotku plochy substrátu značně různily i v rámci jednotlivých vzorků na stanovišti, kde se vzdálenost mezi nimi pohybovala řádově v centimetrech. Titíž autoři zaznamenali také pokles mortality se zvětšující se vzdáleností od místa aplikace *B. t. i.* var. *israelensis*. Suspenze spór se pohybuje v potoce jako poměrně homogenní oblak, který je čím dál po proudu řidší, ale úměrně tomu i delší. Jak ukazují dosavadní výzkumy (Molloy aj., 1981; Lacey aj., 1978; Guillet a Barjac, 1979), jsou řidší suspenze účinné především při vyšších teplotách. Ve vzorcích larev z Dubského potoka, ze stanoviště 700 m vzdáleného od místa vypuštění suspenze, bylo pozorováno nápadně vysoké procento larev posledního instaru s vyvinutými histoblasty (54 %; ve vzorcích z ošetřeného úseku odebraných před aplikací suspenze se larvy posledního instaru vyskytovaly maximálně do 8 %), na stanovišti 1000 m byla věková struktura populace obdobná té, která byla zjištěna v úseku 0 až 400 m (15 % larev posledního instaru). Tnto výkyv ve struktuře populací by mohl být způsoben selektivní vyšší vnímavostí larev mladších instarů, uváděnou různými autory (Molloy a Jamnback, 1981; Molloy aj., 1981; Guillet a Escaffre, 1979), v zóně dozrívající působnosti oblaku suspenze spór, popřípadě sníženým příjmem infikované potravy larev posledního instaru před kuklením. Nelze předpokládat, že by zjištěné výkyvy ve struktuře populací mohly být způsobeny migrací larev, neboť různí autoři (např. Patrusheva, 1972) prokázali, že

IV. Mortalita kontrolních vzorků *O. ornata* odebraných v terénu půl hodiny po aplikaci *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* na jednotlivých stanovištích potoka Rachačka. Každý vzorek obsahoval 100 náhodně vybraných živých larev — The mortality of the control samples of *O. ornata* taken in the field half an hour after the application of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* at the sampling sites of the Rachačka brook. Each sample contained 100 random-selected living larvae

Kontrolní vzorky odebrané na jednotlivých stanovištích 1/2 h po aplikaci <i>B. t. i.</i>	-5 m	5 m	50 m	100 m	300 m
Mortalita za 24 h (%)	13	100	99	98	93

druhy osidlující malé toky migrují jen pomalu a na velmi krátké vzdálenosti. S podobnými koncentracemi suspenze spór pracovali v terénu i Undeen a Colbo (1980) a Undeen aj. (1981); první z prací byla konána v potocích mírného pásma v Kanadě, druhá pak ve střední Americe a Guatemale. V obou případech autoři uvádějí poněkud menší účinnost preparátu. V případě guatemalského experimentu to vysvětlují množstvím tišin v testovaných potocích, které mohou způsobit částečné usazování částic suspenze. V našem případě šlo naopak o toky s rovným korytem a se značně podobnými hydrologickými podmínkami po celé délce sledovaného úseku. Tento fakt by sám o sobě mohl zvýhodňovat použití *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* v regulovaných potocích.

Testování účinku *B. t. i.* na torentikolní organismy, jako jsou larvy muchniček a živočichové, kteří je doprovázejí, působí značné potíže. Používají se žlaby pstružích líhní (Lacey a Mulla, 1977), mechanicky míchané nádoby (Undeen a Nagel, 1978), válce s vodou probublávané vzduchem, nebo larvy uchovávané v tenké vrstvě vody v Petriho miskách při teplotě 4 °C (Weiser a Vaňková, 1979). Ani jedna z těchto metod není přímo srovnatelná s podmínkami v přírodě a všechny získané výsledky jsou zatíženy velikou experimentální chybou. Právě tak zkreslené jsou výsledky hodnocení nezávadnosti mikrobiálních přípravků tzv. pstružím testem, určeným pro testování chemických látek. Tento test nebere v úvahu, že jde o živé organismy, které vydýchají určitý podíl vzduchu ve vodě. Při ošetřeních proti muchničkám jsou vyšší koncentrace mikroba ve vodě přítomny pouze v místě mísení přípravku do vody, zatímco bakteriální mrak probíhá nad osídleným dnem toku po dobu 15 minut. Je tedy třeba stupnici hodnocení podle chemického účinku považovat za nevhodnou a v budoucnu její znění náležitě upravit.

Při pokusech s ošetřením vodních toků jsou pokusy s kompletním zničením fauny muchniček masivní dávkou bakterií sice efektní, ale pro taktiku použití přípravku ne dosti vhodné, protože nepodávají výsledky nejnižších možných koncentrací a výsledky různých změn v proudu a vegetaci. Proto se v našich pokusech jedná o taková ošetření, při nichž ještě zůstává část muchniček zachována a při nichž je možné měřit různé anomálie a rozsah poškození přítomných společenstev.

V obou sledovaných případech byly za použití suspenze o koncentraci 1×10^5 spór na mililitr drasticky omezeny populace muchniček v úseku zhruba do 300 až 500 m od místa aplikace. Vzhledem k tomu, že přípravek není toxický pro predátorské druhy, mohou se jedinci těchto druhů podílet na dalším snížení početnosti takto zdecimovaných populací muchniček. Je nutné si při tom uvědomit, že naprosté vyhubení muchniček na lokalitě je téměř nemožné, protože nelze použít ani jednu ze známých metod, pokud nechceme na dané lokalitě vyhubit téměř všechny bezobratlé živočichy, a že účelem podobných ošetření je omezení početných populací na únosnou míru. Při použití *B. thuringiensis* var. *israelensis* v terénu je nutné také počítat s tím, že přípravek ztrácí na účinnosti při nízkých teplotách (Olejníček aj., v tisku). Na jaře je tedy vhodné použít přípravek až když teplota v potocích vystoupí nad 4 °C (všeobecně čím vyšší teplota vody, tím vyšší účinnost). V průběhu celého roku pak platí nutnost aplikace již v období výskytu mladších larválních instarů.

Autoři děkují s. B. Maryškové za technickou asistenci při terénních i laboratorních sledováních.

Literatura

- BARANOV, N.: Die Kolumbatscher Mücke. Z. Hyg. Zool., 30, 1938, s. 161-178.
- BARANOV, N.: Stand der Kolumbatscher Mückenforschung in Jugoslawien. Z. Parasitenkunde, 11, 1939, s. 214.
- COLBO, M. H. — UNDEEN, A. H.: Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-target insects in stream trials for control of *Simuliidae*. Mosquito News, 40, 1980, s. 368-371.
- GUILLET, P. — BARJAC de H.: Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les lavres de *Simulies vectrices* de l'Onchocercose. C. R. Acad. Sci., Sér. D, 289, 1979, s. 549-552.
- GUILLET, P. — ESCAFFRE, H.: Evaluation de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac pour la lutte contre les lavres de *Simulium damnosum* s. l. I. Résultats des premières essais réalisés sur le terrain. Doc. miméograph. OMS, WHO/VBC/79. 730, Genève, 1979, s. 7.
- JEDLIČKA, L.: Simuliosis a niektoré aspekty medicinského významu muškovitých. Českoslov. Dermatol., 57, 1982a, s. 325-332.
- JEDLIČKA, L.: Niektoré ekonomické aspekty napadania hovädzieho dobytku muškovitými. Zpr. Českoslov. Společ. parasit., 22, 1982b, s. 69.
- KUBEC, J. — MINÁŘ, J.: Uhynutí hovězího dobytku po pobodání muchničkami *Odagmia ornata* (Diptera, Simuliidae). Veterinářství, 18, 1968, s. 372-374.
- LACEY, L. A. — FEDERICI, B. A.: Pathogenesis and Midgut Histopathology of *Bacillus thuringiensis* in *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). J. Invertebr. Pathol., 33, 1979, s. 171-182.
- LACEY, L. A. — MULLA, M. S.: Evaluation of *Bacillus thuringiensis* as a biocide of blackfly larvae (Diptera: Simuliidae). J. Invertebr. Pathol., 30, 1977, s. 46-49.
- LACEY, L. A. — MULLA, M. S. — DULMAGE, H. T.: Some factors affecting the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against blackflies. Envir. Ent., 7, 1978, s. 583-588.
- LEWIS, D. J. — BENNETT, G. F.: An artificial substrate for the quantitative comparison of the densities of larval simuliid (Diptera) populations. Can. J. Zool., 52, 1974, s. 773-775.
- MARTINI, E.: Lehrbuch der medizinischen Entomologie. Jena, Gustav Fischer Verlag 1952. 694 s.
- MINÁŘ, J. — KUBEC, J.: Fatal cases of cattle intoxication due to bites of black flies *Odagmia ornata* (Diptera, Simuliidae). Folia parasit., (Praha), 15, 1968, s. 106.
- MOLLOY, D. — JAMNBACK, H.: Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a Black fly biocontrol agent and its effect on nontarget stream insects. J. Econ. Ent., 74, 1981, s. 314-318.
- MOLLOY, D. — GAUGLER, R. — JAMNBACK, H.: Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of Black fly larvae. J. Econ. Ent., 74, 1981, s. 61-64.
- OLEJNÍČEK, J.: Artificial substrates for quantitative ecological studies of preimaginal populations of blackflies (Diptera: Simuliidae). Acta Univ. Carol., Biol., (1977), 1980, s. 373-375.
- OLEJNÍČEK, J.: Muchničky jako zemědělský a veterinární problém. Veterinářství, 32, 1982a, č. 5, s. 230.
- OLEJNÍČEK, J.: Vliv meliorací na kvantitativní a kvalitativní skladbu muchniček. Zpr. Českoslov. Společ. parasit., 22, 1982b, č. 2, s. 70.
- OLEJNÍČEK, J. — MÁTHA, V. — WEISER, J.: Účinnost *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* proti larvám muchničky *Odagmia ornata* (Mg.) při nízkých teplotách. Folia parasitol. (Praha), v tisku.
- PATRUSHEVA, V. D.: On the migration of Black fly larvae (Diptera, Simuliidae). The fauna and ecology of arthropods from Siberia. Novosibirsk, Nauka 1972, s. 120-129.
- RUBTSOV, I. A.: Man and the blood sucking flies. On the characteristics of their interrelations in historical times. Estratto dalle memorie della Società Entomologica Italiana, 48, 1969, s. 263-268.

STÄMM, K. — ZIEMER, H. G. — RÜHM, W.: Erkrankungen und Todesfälle bei Rindern durch Kriebelmücken. Anz. Schäd.-Kde Pfl.-Umweltschutz, 53, 1980, s. 56-64.

UNDEEN, A. H. — BERL, D.: Laboratory studies on efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac against *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) larvae. Mosquito News, 39, 1979, s. 742-745.

UNDEEN, A. H. — COLBO, M. H.: The efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against black fly larvae (Diptera: Simuliidae) in their natural habitat. Mosquito News, 40, 1980, s. 181-184.

UNDEEN, A. H. — NAGEL, W. L.: The effect of *Bacillus thuringiensis* var. ONR-60A strain (Goldberg) on *Simulium* larvae in the laboratory. Mosquito News, 38, 1978, s. 524-527.

UNDEEN, A. H. — TAKAOKA, H. — HANSEN, K.: A test of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac as a larvicide for *Simulium ochraceum*, the central American vector of onchocerciasis. Mosquito News, 41, 1981, s. 37-40.

WEISER, J. — VÁNKOVÁ, J.: Toxicity of *Bacillus thuringiensis israelensis* for blackflies and other freshwater invertebrates. Progress in invertebrate pathology. Proceedings of the international colloquium on invertebrate pathology and XIth annual meeting society for invertebrate pathology. Prague, CSSR, 1979, s. 11-17.

Došlo dne 11. 4. 1984

ОЛЕЙНИЧЕК, И. — МАТЬГА, В. — БАЙЗР, Я. (Институт паразитологии ЧСАН; Институт энтомологии ЧСАН, Ческе Будеевице): Действие *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* на личинки мошек в полевых условиях южной Чехии. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7): 433-441.

В двух ручьях с искусственно упорядоченным руслом в районе города Ческе Будеевице нами было апробировано действие суспензии спор *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* на личинки мошек. Обе исследуемые местности были образованы мелкими ручьями с искусственно упорядоченным руслом с трапециевидным профилем, вымощенные, с растительностью разной плотности, со скоростью течения в пределах 40—90 см/сек. В обоих случаях была применена лиофилизированная суспензия производства фирмы Roger Bellon, конечная концентрация которой составляла 1×10^5 спор в мл⁻¹. За действием спор велись наблюдения как в искусственных и природных субстратах в полевых условиях, так и в лаборатории на личинках, поставляемых из отдельных контрольных пунктов. В обоих случаях в наблюдаемых участках ручьев была установлена 90—100% гибель личинок мошек, причем как в образцах, поставляемых в лабораторию, так и в искусственных субстратах. В области угасающего действия суспензии спор у популяций личинок в исследуемой местности определен более высокий процент личинок в последней стадии развития, что соответственно с мнением других авторов можно объяснять более высокой чувствительностью молодых личинок к воздействию препарата. В результате осуществленных исследований было установлено, что *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* представляет собой эффективное средство для подавления центрально-европейских видов мошек, в особенности в случае чрезмерного размножения некоторых с ветеринарной точки зрения значимых видов в водных течениях с искусственно упорядоченным руслом.

Simuliidae; *Bacillus thuringiensis* H-14; водные течения с искусственно упорядоченным руслом

OLEJNÍČEK, J. — MATĚA, V. — WEISER, J. (Institute of Parasitology and Institute of Entomology, Czechoslovak Academy of Sciences, České Budějovice): The Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against Black Fly Larvae under the Field Conditions of South Bohemia. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7): 433-441.

The effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spore suspension against black fly larvae was tested in two regulated brooks in the České Budějovice district, South Bohemia. The sites under study were small, regulated, paved brooks of trapezoidal profile, with vegetation of different density, and with stream flow rates ranging from 40 to 90 cm/sec. Lyophilized spores (produced by Roger Belon) at a final concentration of 1×10^5 spores per ml were used. The spore efficacy was determined in both natural and artificial substrates in the field and under

laboratory conditions, on the larvae collected at the control sites. A 90–100% mortality of the larvae was recorded in all parts of the brooks examined both in the natural samples studied in laboratory and in those kept on artificial substrates. In the area of fading spore suspension action, a higher percentage of the last-instar larvae was found in larval population which may be ascribed, in agreement with other authors, to an increased susceptibility of younger larvae to the preparation. The results of the tests demonstrated that *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is an effective agent to control the black fly species occurring in Central Europe and may be of value mainly in the control of some species of veterinary importance overpopulated in regulated brooks.

Simuliidae; *Bacillus thuringiensis* H-14; regulated brooks

OLEJNÍČEK, J. — MATHA, V. — WEISER, J. (Parasitologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften; Entomologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, České Budějovice): *Wirksamkeit des Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gegen Larven der Kriebelmücke in Terrainbedingungen Südböhmens. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 433–441.

An zwei regulierten Bächen im Kreis České Budějovice testeten wir die Wirksamkeit der Sporensuspension von *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gegen Kriebelmückenlarven. Beide Lokalitäten bestanden aus kleineren regulierten Bächen von gepflastertem Trapezprofil, mit unterschiedlich dichter Vegetation und einer Durchflußgeschwindigkeit im Bereich von 40 bis 90 cm.sec⁻¹. In beiden Fällen wurden lyophilisierte Sporen aus der Produktion Roger Bellon in einer Endkonzentration von 1×10^5 Sporen pro Milliliter angewandt. Die Wirkung der Sporen wurde sowohl auf natürlichen als auch künstlichen Substraten im Terrain sowie im Labor an aus den einzelnen Kontrollstandorten hergebrachten Larven untersucht. In beiden Fällen wurde in den kontrollierten Abschnitten der Bäche eine Mortalität der Kriebelmückenlarven von 90 bis 100% verzeichnet und dies sowohl bei den ins Labor gebrachten Proben als auch auf den künstlichen Substraten. Im Bereich der abklingenden Wirksamkeit der Sporensuspension wurde in den Larvenpopulationen der Lokalität eine höhere Rate von Larven des letzten Instars gefunden, was sich im Einklang mit anderen Autoren als eine höhere Empfindlichkeit der jüngeren Larven gegenüber dem Präparat deuten läßt. Die Ergebnisse der Tests erwiesen, daß der *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ein geeignetes Mittel zur Vertilgung der mitteleuropäischen Arten der Kriebelmücken ist, insbesondere bei der Massenvermehrung mancher Arten auf regulierten, vom Gesichtspunkt der Tiergesundheit bedeutungsvollen Flüssen.

Simuliidae; *Bacillus thuringiensis* H-14; regulierte Flüsse

Adresy autorů:

RNDr. Jiří Olejníček, CSc., Parazitologický ústav ČSAV, Na sádkách 702, 370 05 České Budějovice

Ing. Vladimír Matha, RNDr. Jaroslav Weiser, DrSc., Entomologický ústav ČSAV, Na sádkách 702, 370 05 České Budějovice

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, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Půjčovní doba: pondělí, úterý a čtvrtek od 9.00 do 16.30 hodin, středa od 9.00 do 18.00 hodin, pátek od 9.00 do 15.30 hodin. U každé žádané publikace uveďte signaturu.

Klauenpflege bei Rind und Schaf.

D 31.783/1983/83

Bonn, Auswertungs- u. Informationsdienst f. Ernährung, Landw. u. Forsten (AID) e. V. 1983. 20 s., obr. AID 83/1983. (Skot — paznehty — ošetřování / Ovce — paznehty — ošetřování)

ALLOTT, D. — DAVIES, R.

E 19.689 841

Footbaths for dairy cows.

Alnwick, Min. of agric., fisheries and food 1983. 4 s., obr. Leaflet 841. (Dojnice — nemoci — paznehty — ochrana — dezinfekční koupele — použití)

SALESSE-LAVERGNE, B. J. M.

D 38.168 1983/81

Contribution a l'etude de l'infertilité chez la vache apres césarienne.

Toulouse, École nationale vétérinaire 1983. 53 s., tab. (Dojnice — císařský řez — výzkum — Francie — disertace)

BARBER, D. M. L.

C 28.410 194

Infectious bovine keratoconjunctivitis (new forest disease).

Ayr, The West of Scotland agric. college 1983. 3 s. Technical note 194. (Skot — nemoci oční — keratokonjunktivitida)

C 27.494 919

An economic analysis of mastitis control measured for selected Washington dairy herds.

Washington, State Univ. Agric. res. center 1982. 13 s., obr., tab. (Skot mléčný — nemoci — mastitida — ochrana a léčení — ekonomické otázky — ekonomická analýza — USA — Washington)

HOPP, W.

E 38.066 1091

Pathogenese und Klinik der Aujeszky'schen Krankheit des Rindes nach experimenteller Infektion über den Atmungs-, Verdauungs- und Geschlechtsapparat sowie über die Haut. Inaug.-Diss. d. Tierärztl. Hochschule Hannover.

Hannover, Tierärztl. Hochschule 1983. 148 s., obr., tab. (Aujeszkého nemoc — skot — infekce umělá — výzkum — NSR — disertace)

VPLYV DICHLÓRVOU A METATIONU NA VYBRANÉ ENZÝMY PRVOKA *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

F. Ništiar, J. Hrušovský, J. Mojžiš

NIŠTIAR, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — MOJŽIŠ, J. (Vojenský veterinárny doškolovací a výskumný ústav, Košice): *Vplyv dichlórvosu a metationu na vybrané enzýmy prvoka Tetrahymena pyriformis*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 443-447.

Sledovali sme vplyv dichlórvosu a metationu na aktivitu acetylcholinesterázy u prvoka *Tetrahymena pyriformis*. U dichlórvosu bola najvyššia inhibícia aktivity enzýmu zistená po 30 minútach. 50% inhibícia aktivity enzýmu bola zaznamenaná pri dávke 1,22 mg.l⁻¹. Najvyššiu inhibíciu aktivity enzýmu u metationu sme zistili po 60 minútach. 50% inhibícia aktivity enzýmu bola zaznamenaná pri dávke 879,2 ng.l⁻¹. 60 minút po expozícii touto dávkou bola zaznamenaná takmer 75% inhibícia aktivity enzýmu. Stanovenie aktivity acetylcholinesterázy zvyšuje citlivosť bio-testu na organofosfáty za využitia prvoka *Tetrahymena pyriformis*. Pri sledovaní vplyvu dichlórvosu v supratoxických dávkach 50,0; 100,0 a 150,0 mg.l⁻¹ sme zistili, že aktivita laktátdehydrogenázy bola potlačená takmer na 100%; u alanín aminotransferázy bola inhibícia aktivity výrazná. Slabšia inhibícia aktivity bola zaznamenaná u aspartát aminotransferázy, alkalickéj a kyslej fosfatázy, u alfa-amylázy sa aktivita zvýšila. Dávkovú závislosť sa nám nepodarilo dokázať.

pesticidy; organofosfáty; acetylcholinesteráza; enzýmy; bio-test

Z oblasti reziduí xenobiotík je v súčasnosti stredom pozornosti kontaminácia požívatín pesticídmi (S z o k o l a y, 1982), či už na báze chlórovaných uhľovodíkov, organofosfátov, karbamátov alebo iných herbicídov. V poslednom období boli predložené rôzne metodické postupy na screening, resp. kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu týchto xenobiotík v biologických materiáloch a v biologickom prostredí. Doteraz používanými metódami detekcie boli prevažne fyzikálno-chemické analýzy, založené na princípe chromatografie a spektrofotometrie, ako aj biologické metódy, najmä na screening, založené na využití hmyzu, kôrovcov, rýb a rastlín ako testovacích objektov. Uvedené metódy sú ekonomicky nákladné, vyžadujú vysokú erudíciu pracovného personálu a pracoviská vybavené špeciálnou prístrojovou technikou. To je doménou len obmedzeného počtu pracovísk v ČSSR. Zvlášť neuspokojivá je situácia v oblasti rozpracovania rýchlych metodík na stanovenie xenobiotík v terénnych podmienkach (t. j. v poľnohospodárskych laboratóriách).

V dostupnej literatúre už bola zmienka o možnostiach využiť pre tieto účely jednoduché biologické testovacie objekty (Z w e i g, 1963; I g n a t e v a Š a b l i j, 1978). Na našom pracovisku sa zaoberáme možnosťou využitia testovacieho objektu prvoka *Tetrahymena pyriformis*.

mis W na stanovenie xenobiotík v biologických materiáloch a v biologickom prostredí (Ništiar a i., 1981, 1984; Ništiar a Ništiarová, 1983). Zistili sme, že tento testovací objekt je dostatočne citlivý na organofosfáty; LD₅₀ pre dichlórvos je 4,9 mg.l⁻¹ a pre metation 8,94 µg.l⁻¹. Už pri týchto prácach sme upozornili na to, že rozšírením stanovenia letality xenobiotík o stanovenie 50% inhibície určitého kľúčového enzýmu sa citlivosť testu v značnej miere môže zvýšiť.

V predloženej práci sme sa zamerali na sledovanie vplyvu dichlórvosu a metationu na aktivitu enzýmu acetylcholinesterázy (AChE, E.C.3.1.1.7.) a dichlórvosu na aktivitu laktát dehydrogenázy (LD, E.C.1.1.1.27.), aspartát aminotransferázy (AST, E.C.2.6.1.1.), alanín aminotransferázy (ALT, E.C.2.6.1.2.), alkalické fosfatázy (ALP, E.C.3.1.3.1.), kyslej fosfatázy (ACP, E.C.3.1.3.2.) a alfa-amylázy (AMS, E.C.3.2.1.1.).

MATERIÁL A METÓDA

Prvok *Tetrahymena pyriformis* kmeň W bol kultivovaný v médiu, ktoré pozostávalo z proteóza-peptónu (0,1%), kvasničného extraktu (0,02%) a glukózy (0,02%). Aktivita enzýmov bola stanovená po 24-hodinovej kultivácii populácie. Acetylcholinesterázu sme stanovili metódou podľa Tulacha (1958) vo vlastnej modifikácii tak, že lýzu buniek sme vykonali v roztoku 1,0% Tritonu X 100 v 0,5 mol.l⁻¹ Tris-HCl pufre o pH 7,6 za 30, 60 a 120 minút po expozícii organofosfátmi. K 0,5 ml uvedeného lyzátu sme pridali 3,5 ml vyšetrovanej kultúry populácie prvoka *Tetrahymena pyriformis*. Ostatné enzýmy (laktát dehydrogenáza, aspartát aminotransferáza, alanín aminotransferáza, alkalická fosfatáza, kyslá fosfatáza a alfa-amyláza) boli stanovené komerčne vyrábanými testmi fy Lachema Bio-La-test po lýze tak, ako sme uviedli pri stanovení aktivity acetylcholinesterázy. Všetky enzýmy boli pri stanovení aktivity inkubované pri teplote 25 °C a stanovené 30 minút po expozícii dichlórvosom. Celkové proteíny boli stanovené biuretovou metódou. Pre každé vyšetrenie sme robili 12 paralelných vzoriek. Aktivitu enzýmov sme vyjadrili v nmol substrátu premeneného za minútu na miligram proteínu buniek.

Dichlórvor (0,0-dimetyl-0-/2,2-dichlórvinyl/-fosfát, vyrobený v ZSSR, s 95,9% účinnosťou) bol použitý v testoch na sledovanie aktivity acetylcholinesterázy v dávkach 76,49 µg.l⁻¹ a 1,22 a 4,0 mg.l⁻¹, u ostatných enzýmov v supratoxických dávkach 50,0, 100,0 a 150,0 mg.l⁻¹ média.

Metation (0,0-dimetyl-0-/3-metyl-4-nitrofenyl/-tiofosfát, vyrobený v CHZJD Bratislava, s 98,0% účinnosťou) bol použitý v dávkach 879,2 ng a 1,98 a 29,7 µg.l⁻¹ média.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vplyv dichlórvosu a metationu na aktivitu acetylcholinesterázy uvádzame v tab. I. Na základe zistených údajov môžeme konštatovať, že dichlórvos v sledovaných dávkach výrazne potláčal aktivitu acetylcholinesterázy. Inhibícia aktivity bola najvýraznejšia 30 minút po expozícii, kedy 50% inhibícia aktivity bola pri dávke cca 1,22 mg.l⁻¹ média. Potom sa enzým postupne reaktivoval pri všetkých sledovaných dávkach. Metation vykazoval najvyššiu inhibíciu aktivity acetylcholinesterázy 60 minút po expozícii. Tento poznatok je v súlade s pozdejším nástupom účinku tohto organofosfátu u cicavcov. 50% inhibícia aktivity enzýmu bola zaznamenaná pri dávke metationu 879,2 ng.l⁻¹ média; 60 minút po expozícii bola pri tejto dávke zaznamenaná takmer 75% inhibícia aktivity enzýmu.

I. Vplyv dichlórvosu a metationu na aktivitu acetylcholinesterázy u prvoka *Tetrahymena pyriformis* W — The effect of dichlorvos and metathion on acetylcholinesterase activity in the *Tetrahymena pyriformis* W protozoan

Čas	30 minút		60 minút		120 minút	
Noxa	aktivita	%	aktivita	%	aktivita	%
Kontrola	25,31 (24,37–25,9)	100,0	25,94 (24,7–26,2)	100,0	25,48 (24,4–16,0)	100,0
DDVP 4,0 mg	5,55	21,9	8,17	31,5	9,81	38,5
DDVP 1,22 mg	11,13	44,0	14,38	55,4	18,78	73,7
DDVP 76,49 µg	22,45	88,7	22,72	87,6	22,71	89,1
Metation 28,7 µg	8,35	33,0	1,58	6,1	1,95	7,7
Metation 1,98 µg	8,94	35,3	3,98	15,0	9,10	35,7
Metation 879,2 ng	12,78	50,5	6,68	25,7	13,30	52,2

DDVP = dichlórvos

Pri sledovaní vplyvu supratoxických dávok dichlórvosu na aktivitu vybraných enzýmov (tab. II) sa nám podarilo dokázať len veľmi nízku aktivitu u laktát dehydrogenázy. Výrazne bola potlačená aktivita alanín aminotransferázy. Aktivita aspartát aminotransferázy, alkalickéj a kyslej fosfatázy boli tiež inhibované. Jedine alfa-amyláza vykazovala vyššiu aktivitu. Významnú dávkovú závislosť pri týchto supratoxických dávkach sa nám nepodarilo dokázať. U všetkých dávok došlo v uvedenom čase, t. j. 30 minút po expozícii, k poklesu počtu živých buniek na 8 až 12 % pôvodných hodnôt, s výraznou hypomotilitou, zaguľatením a so známami vakuolárnej degenerácie.

Uvedené výsledky potvrdili naše predpoklady o zvýšení citlivosti metódy stanovením inhibície aktivity acetylcholinesterázy pri stanovení organofosfátov v biologických materiáloch využitím testovacieho objektu — prvoka *Tetrahymena pyriformis*.

II. Vplyv dichlórvosu na vybrané enzymové aktivity u prvoka *Tetrahymena pyriformis* W — The effect of dichlorvos on selected enzyme activities in the *Tetrahymena pyriformis* W protozoan

Dávka DDVP mg.l ⁻¹	LD		AST		ALT		ALP		ACP		AMS	
	nmol	%	nmol	%	nmol	%	nmol	%	nmol	%	nmol	%
Kontrola	2,50	100,0	19,0	100,0	27,9	100,0	75,0	100,0	26,0	100,0	4,89	100,0
150	0	0	14,0	73,7	10,3	36,9	43,8	58,4	22,2	85,4	7,57	154,8
Kontrola	3,00	100,0	16,0	100,0	25,0	100,0	82,0	100,0	26,0	100,0	5,10	100,0
100	0,18	6,0	13,7	85,6	8,2	32,8	50,0	61,0	16,8	64,6	8,10	158,8
Kontrola	2,70	100,0	17,1	100,0	28,0	100,0	76,1	100,0	26,0	100,0	4,80	100,0
50	0,17	6,3	13,6	79,5	17,6	62,9	61,7	81,1	22,3	85,8	6,00	125,0

Literatúra

IGNATEV, A. D. — ŠABLIJ, V. Y.: Ispol'zovanie infuzorii Tetrachimeny piriformis kak test-objekta pri biologičeskikh issledovanijach v sel'skom chozjajstve. Moskva, VASCHNIL 1978, s. 1-52.

NIŠTIAR, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — BENEŠ, J.: Využitie prvoka *Tetrahymena pyriformis* pre testovanie kontaminácie biologických materiálov organofosfátmi a karbamátmi. Veter. Med. (Praha), 26, 1981, s. 695-700.

NIŠTIAR, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — MOJŽIŠ, J.: Vplyv niektorých pesticidov na prvoka *Tetrahymena pyriformis*. Veter. Med. (Praha), 29, 1984, s. 699-704.

NIŠTIAR, F. — NIŠTIAROVÁ, A.: Využitie jednoduchých organizmov ako test-objektov v biológii a medicíne. Sbor. Fyz. Med. Biol., Praha, JČSMF 1983, s. 26-40.

SZOKOLAY, A.: Komplexná ochrana akosti požívatín. Bull. potr. Výsk., 21, 1982, č. 1, s. 3-8.

TULACH, J.: Kolorimetrické stanovení cholinesterasy v lidské krvi. Voj. zdrav. Listy, 27, 1958, s. 513-515.

ZWEIG, G. (ed.): Analytical methods for pesticides. New York — London, Academic Press 1963.

Došlo dňa 15. 10. 1984

НИШТИАР, Ф. — ГРУШОВСКИ, И. — МОЙЖИШ, Я. (Военный ветеринарный обучающий и научно-исследовательский институт, Кошице): Влияние дихлорвоса и метатиона на некоторые ферменты протиста *Tetrahymena pyriformis*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7): 443-447.

Определяли влияние дихлорвоса и метатиона на активность ацетилхолинэстеразы у протиста *Tetrahymena pyriformis*. У дихлорвоса макс. ингибирующая активность фермента обнаружена спустя 30 мин. 50 %-я ингибция активности отмечена у дозы 1,22 мг. л⁻¹. Максимальная ингибция у метатиона установлена через 60 мин. 50 %-я ингибция отмечена у дозы 879,2 нг. л⁻¹. Через 60-минутной выдержки этой дозы отмечена почти 75 %-я ингибция активности фермента. Определение активности ацетилхолинэстеразы повышает чувствительность био-теста на органофосфаты посредством протиста. При определении влияния дихлорвоса в супратоксических дозах 50,0; 100,0; 150,0 мг. л⁻¹ активность лактатдегидрогеназы подавлялась почти на 100 %; у аламинотрансферазы активность ингибировалась заметно, а в слабой мере — у аспаргатаминотрансферазы, щелочной и кислой фосфатазы; у альфа-амилазы активность повышалась. Не удалось доказать ее зависимости от дозировки.

пестициды; органофосфаты; ацетилхолинэстераза; ферменты; био-тест

NIŠTIAR, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — MOJŽIŠ, J. (Military Veterinary Extension and Research Institute, Košice): The Effect of Dichlorvos and Metathion on the Selected Enzymes of the *Tetrahymena pyriformis* Protozoan. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7): 443-447.

The effect of dichlorvos and metathion was studied as exerted on acetylcholinesterase activity in the protozoan *Tetrahymena pyriformis*. In dichlorvos, the highest enzyme activity inhibition was obtained after 30 minutes. A 50% inhibition of the enzyme activity was recorded at the dose of 1.22 mg per litre. As to metathion, the highest enzyme activity inhibition was obtained after 60 minutes. A 50% inhibition of the enzyme activity was recorded at the dose of 879.2 ng per litre. One hour after exposure to this dose, almost 75% inhibition of the activity of the enzyme was recorded. The determination of acetylcholinesterase activity increases the sensitivity of the bioassay for organophosphates with the use of the *Tetrahymena pyriformis* protozoan. Dichlorvos was studied for its action at supratoxic doses (50.0, 100.0 and 150.0 mg per litre) and it was found that lactate dehydrogenase activity was almost completely suppressed; the inhibition of alanine aminotransferase was pronounced. A weaker activity inhibition was recorded in aspartate aminotransferase, alkaline and acid phosphatase; the activity of alpha-amylase increased. No dependence on dosage was demonstrated.

pesticides; organophosphates; acetylcholinesterase; enzymes; bioassay

NIŠTIAR, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — MOJŽIŠ, J. (Militärinstitut für veterinärmedizinische Fortbildung und Forschung, Košice): *Einfluß von Dichlorphos und Metathion auf ausgewählte Enzyme des Urtierchens Tetrahymena pyriformis*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (7) : 443-447.

Wir untersuchten den Einfluß von Dichlorphos und Metathion auf die Aktivität der Azetylcholinesterase beim Urtierchen *Tetrahymena pyriformis*. Beim Dichlorphos wurde die höchste Inhibition der Enzymaktivität nach 30 Minuten festgestellt. Eine 50 %ige Inhibition der Enzymaktivität wurde bei der Dosis von $1,22 \text{ mg.l}^{-1}$ verzeichnet. Beim Metathion stellten wir die höchste Inhibition der Enzymaktivität nach 60 Minuten fest. Die 50 %ige Inhibition der Enzymaktivität wurde bei der Dosis $879,2 \text{ ng.l}^{-1}$ verzeichnet. 60 Minuten nach der Exposition durch diese Dosis wurde eine nahezu 75 %ige Inhibition der Enzymaktivität verzeichnet. Eine Bestimmung der Azetylcholinesteraseaktivität steigert die Sensibilität des Bio-Tests auf Organophosphate unter Anwendung des Urtierchens *Tetrahymena pyriformis*. Bei Untersuchungen über den Einfluß von Trichlorphos in supratoxischen Dosen von 50,0; 100,0 und $150,0 \text{ mg.l}^{-1}$ stellten wir fest, daß die Aktivität der Laktatdehydrogenase nahezu 100 %ig unterbunden wurde; bei der Alaninaminotransferase war die Inhibition der Aktivität beträchtlich. Eine mäßigere Inhibition der Aktivität wurde bei der Aspartat-aminostransferase und der Alkali- und Säurephosphatase verzeichnet, bei der Alpha-Amylase erhöhte sich die Aktivität. Eine dosisbedingte Abhängigkeit konnten wir nicht nachweisen.

Pestizide; Organophosphate; Azetylcholinesterase; Enzyme; Bio-Test

Adresa autorov:

MVDr. František Ništiar, CSc., prof. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., MVDr. Ján Mojžiš, Vojenský veterinárny doškoľovací a výskumný ústav, pošt. priečinok B-35, 041 15 Košice

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 8 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny články:

- M. Granátová, A. Kozáková: Průkaz protilátek v séru leukózního skotu
- J. Marek, J. Meisl: Diagnostika osteopatií u skotu metodou kostní biopsie
- V. Šedinová, E. Urbanová, J. Škarda, A. Jukl: Stanovení počtu somatických buněk v mléce rychlou difenylamin DNA filtr metodou
- B. Skalka: Aktualizované schéma pro diagnostiku stafylokoků
- B. Pástorová, J. Arendarčík, M. Molnárová: Hladiny katecholových amínů v hypothalamu, hypofýze a v nadobličkách po celotelové expozici gama-žiarění
- J. Štíhl, J. Konrád: Využití akupunktury k resuscitaci zvířat
- R. Handl: Efektivnost povrchově fixačního testu v diagnostice brucelózy zajíců
- M. Svoboda, V. Svobodová: Neonatální toxoplazmóza koťat

OBSAH

Kozumplík J., Sosnová J.: Termorezistentní test spermií a plodnost býků	385
Toman M., Pšíkal I.: Test fagocytární aktivity krevních leukocytů telat	393
Toman M., Pšíkal I., Menšík J.: Fagocytární aktivita krevních leukocytů telat od narození do věku tři měsíce	401
Urbanová E., Šedinová V., Škarda J., Škardová O., Jukl A.: Využití membránových filtrů Synpor pro separaci a stanovení počtu somatických buněk mléka dojnic indol DNA filtr metodou	409
Šmíd B., Valíček L., Rodák L., Jurák E., Herzig I., Dvořáček L.: Přežívání viru Aujeszkyho choroby (ACH) v infikované prasečí kejdě	419
Štill J., Konrád J.: Srovnání diagnostických možností palpce břišní dutiny a ušní akupunktury u onemocnění gastrointestinálního traktu u psů	425
Olejníček J., Matka V., Weiser J.: Účinnost <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> proti larvám muchniček v terénních podmínkách jižních Čech	433
Ništiar F., Hrušovský J., Mojžiš J.: Vplyv dichlórvosu a meta-tionu na vybrané enzymy prvoka <i>Tetrahymena pyriformis</i>	433

СОДЕРЖАНИЕ

Козумплик Я., Соснова Я.: Терморезистентный тест спермиев и плодovitость быков	385
Томан М., Пшикал И.: Тест фагоцитарной активности кровяных лейкоцитов телят	393
Томан М., Пшикал И., Меншик Я.: Фагоцитарная активность кровяных лейкоцитов телят от рождения до 3-месячного возраста	401
Урбанова Э., Шединова В., Шкарда Й., Шкардова О., Юкл А.: Применение мембранных фильтров Синпор в сепарации и определении соматических клеток в молоке коров по индолфилтратметоду ДНА	409
Шмид Б., Валичек Л., Родак Л., Юрак Е., Герциг И., Дворжачек Л.: Выживание вируса болезни Ауески (БА) с инфицированной свиной кейде	419
Штилл Я., Конрад Я.: Сравнение диагностических возможностей пальпации брюшной полости и ушной акупунктуры при заболеваниях гастроинтестинального тракта собак	425
Олейничек Й., Матьга В., Вайзр Я.: Действие <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> на личинки мошек в полевых условиях южной Чехии	433
Ништиар Ф., Грушовски Й., Мойжиш Я.: Влияние дихлорвоса и метатона на некоторые ферменты протиста <i>Tetrahymena pyriformis</i>	443

CONTENTS

Kozumplík J., Sosnová J.: The Thermoresistance Test of Spermatozoa and the Fertility of Bulls	385
Toman M., Pšíkal I.: The Phagocytic Activity Test in the Blood Leucocytes of Calves	393
Toman M., Pšíkal I., Menšík J.: The Phagocytic Activity of Blood Leucocytes in Calves from Birth to the Age of Three Months	401

Urbanová E., Šedinová V., Škarda J., Škardová O., Jukl A.: The Use of the Synpor Membrane Filters for Separation and Estimation of Milk Somatic Cells of Dairy Cows by the Indole DNA Filter Method	409
Šmíd B., Valíček L., Rodák L., Jurák E., Herzig I., Dvořáček L.: The Survival of the Aujeszky's Disease Virus (ADV) in Infected Pig Slurry	419
Štill J., Konrád J.: A Comparison of the Diagnostic Possibilities of Abdominal Cavity Palpation and Ear Acupuncture in Dogs Suffering from Disorders in the Gastrointestinal Tract	425
Olejníček J., Mařha V., Weiser J.: The Effectiveness of <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> against Black Fly Larvae under the Field Conditions of South Bohemia	433
Ništiar F., Hrušovský J., Mojžiš J.: The Effect of Dichlorvos and Metathion on the Selected Enzymes of the <i>Tetrahymena pyriformis</i> Protozoan	443

INHALT

Kozumplik J., Sosnová J.: Thermoresistenztest von Spermien und die Fruchtbarkeit bei Bullen	385
Toman M., Pšikal I.: Test der phagozytären Aktivität von Blutleukozyten der Kälber	393
Toman M., Pšikal I., Menšík J.: Phagozytäre Aktivität der Blutleukozyten von Kälbern von der Geburt bis zum Alter von drei Monaten	401
Urbanová E., Šedinová V., Škarda J., Škardová O., Jukl A.: Anwendung der Membranfilter Synpor zur Separation und Bestimmung der Zahl somatischer Zellen in der Kuhmilch mittels Indol-DNA-Filter-Methode	409
Šmíd B., Valíček L., Rodák L., Jurák E., Herzig I., Dvořáček L.: Überlebensfähigkeit von Viren der Aujeszky'schen Krankheit (ACH) in infizierter Schweinegülle	419
Štill J., Konrád J.: Vergleich der diagnostischen Möglichkeiten von Palpation der Bauchhöhle und Akupunktur der Ohren bei Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes bei Hunden	425
Olejníček J., Mařha V., Weiser J.: Wirksamkeit des <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> gegen Larven der Kriebelmücke in Terrainbedingungen Südböhmens	433
Ništiar F., Hrušovský J., Mojžiš J.: Einfluß von Dichlorphos und Metathion auf ausgewählte Enzyme des Urtierchens <i>Tetrahymena pyriformis</i>	443

Rukopisy odevzdány k tisku 5. 4. 1985 — Podepsáno k tisku 5. 6. 1985

Rozšiřuje PNS. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá každá administrace PNS, pošta, doručovatel a PNS-ÚED Praha, závod 01 — AOT, Kafkova 19, 160 00 Praha 6; PNS-ÚED Praha, závod 02, Obránců míru 2, 656 07 Brno; PNS-ÚED Praha, závod 03, Kubánská 1539, 708 72 Ostrava-Poruba. Objednávky do zahraničí vyřizuje PNS — ústřední expedice a dovoz tisku Praha, závod 01, administrace vývozu tisku, Kafkova 19, 160 00 Praha 6. Vytiskl MÍR, novinářské závody, n. p., závod 6, tř. Lidových milicí 22, 120 00 Praha 2.