

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

8

ROČNÍK 30 (LVIII)

PRAHA

SRPEN 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 Koloman 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 Polák, CSc., MVDr. Josef Straka, CSc., prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc.

Za vedení časopisu odpovídá akademik Otto Jaroslav Vrtiak

Redaktorka ing. Jovanka Václavičková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství,
Praha 1985

■

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozboru a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Československá akademie zemědělská — Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství. Vychází měsíčně. Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné Kčs 120,—.

■

Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзоры, анализы и научные статьи о решенных задачах по научному исследованию в области ветеринарии. Издает Чехословацкая сельскохозяйственная академия — Институт научно-технической информации по сельскому хозяйству. — Выход в свет ежемесячно. Редакция 120 56 Прага 2, 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. Published by the Czechoslovak Academy of Agriculture — Institute of Scientific and Technical Information for Agriculture. Issued monthly. Editorial office 120 56 Prague 2, Slezská 7.

■

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

PRŮKAZ CYTOTOXICKÝCH PROTILÁTEK V SÉRU LEUKÓZNÍHO SKOTU

M. Granátová, A. Kozáková

GRANÁTOVÁ, M. — KOZÁKOVÁ, A. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Průkaz cytotoxických protilátek v séru leukózního skotu*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 449-456.

Na souboru 55 vzorků sér ze stáda býků silně zamořeného boviní leukózou byla ověřena použitelnost cytotoxického testu v diagnostice boviní leukózy a výsledky byly srovnány s imunodifúzním testem v agaru. Oba testy vykazují přibližně stejnou citlivost, neboť u každého vyšetřovaného vzorku výsledky v cytotoxickém testu alespoň ve dvou ředěních séra ze tří (1 : 2, 1 : 5 a 1 : 7) odpovídaly imunodifúznímu testu. Bylo zjištěno, že pro cytotoxický test je vyhovující konečné ředění séra 1 : 5. Zároveň bylo ověřeno, že boviní fetální sérum, nutné pro růst buněčných kultur, může být nahrazeno boviním sérem opračovaným 40% roztokem polyetylglykolu (PEG) 6000, aniž by byly výsledky cytotoxického testu ovlivněny.

virus boviní leukémie; cytotoxický test; imunodifúzní test; polyetylglykol 6000; buněčné kultury

Séra skotu ze stád promořených boviní leukózou obsahují protilátky závislé na komplementu, které *in vitro* lyzují cílové, virem boviní leukémie (BLV) infikované buňky. Na základě tohoto zjištění sestavili Honma aj. (1980) a Watarai aj. (1981) cytotoxický test (CDAC — complement dependent antibody cytotoxicity). Tento test využívá při detekci protilátek ve vyšetřovaném séru virové antigeny na povrchu cílových buněk. Cytolytické látky jsou přítomny v antisérech proti glykoproteinovému obalu viru BLV, ale antiséra proti vnitřnímu virovému proteinu p 24 je neobsahují.

Cílem naší práce bylo jednak porovnat výsledky cytotoxického testu s hodnotami získanými vyšetřením sér imunodifúzním testem v agaru (ID), jednak sledovat, jaké konečné ředění vyšetřovaného séra je vhodné pro využití v cytotoxickém testu.

MATERIÁL A METODA

VYŠETŘOVANÁ SÉRA

Imunodifúzní test v agaru i cytotoxický test byly provedeny s 55 vzorky krevních sér získaných ze stáda býků silně zamořeného boviní leukózou.

Pro ID bylo užito sérum neředěné, pro CDAC byl vzorek každého séra inaktivován a ředěn fyziologickým roztokem tak, aby konečné ředění v jamce destičky

po smíchání buněčné suspenze, komplementu a séra bylo 1:2, 1:5 a 1:7. Pro poměr 1:2 bylo tedy užito sérum neředěné.

IMUNODIFÚZNÍ TEST V AGARU

Jamky v agarovém gelu o průměru 0,5 cm byly naplněny vzorky sér, kontrolním pozitivním sérem a antigenem (souprava na sérologickou diagnostiku leukózy hovězího dobytka imunodifúzním testem AGEBION BLV, Bioveta Nitra). Po osmačtyřicetihodinové inkubaci při laboratorní teplotě se v šikmém spodním osvětlení hodnotily precipitační linie.

CYTOTOXICKÝ TEST

Úprava kultivačního séra

V cytotoxickém testu bylo bovinní fetální sérum nahrazeno bovinním sérem, ze kterého byly odstraněny protilátky a nespecifické inhibitory vysrážením pomocí polyetylglykolu (PEG 6000), připraveného podle Durhama aj. (1982) jako 40% roztok v minimálním esenciálním médiu MEM/TM SEVAC VII a sterilovaného autoklávováním. Tento roztok byl přidán k bovinnímu inaktivovanému séru (30 minut při teplotě 56 °C) v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace v séru byla 10%, a směs byla ponechána 12 hodin při teplotě +4 °C. Po centrifugaci (200 g po dobu 20 minut) byl precipitát odstraněn a sérum uchováno při teplotě -25 °C.

Buňky

Jako cílových buněk v cytotoxickém testu bylo užito buněk linie fetální jehněčí sleziny FLS (fetal lamb spleen), klon G-I/II, které jsou infikovány virem BLV a trvale jej produkují.

Buňky FLS byly pěstovány v médiu MEM, doplněném 10% fetálního bovinního séra (JZD Sokolnice) nebo 10% bovinního séra (Bioveta Opava) opracovaného 10% roztokem PEG 6000.

Příprava komplementu

Jako zdroje komplementu bylo užito králíčího séra. Krev získaná ze 30 králíků byla smíchána, po sražení v chladu odstředěna v chlazené odstředivce (+4 °C) po dobu 40 minut při 300 g. Před použitím komplementu byla kontrolována jeho lytická účinnost na buňky FLS; po pětáctýřicetiminutové inkubaci při teplotě 37 °C byla životnost buněk 99%.

Vlastní provedení cytotoxického testu

Monolayer buněk FLS byl po odstranění růstového média dvakrát opláchnut pufrovaným fyziologickým roztokem a po trypsinaci resuspendován v médiu MEM bez séra. V tomto médiu byly buňky dvakrát promyty (150 g po dobu 10 minut) a potom naředěny na koncentraci 5×10^6 buněk/ml.

Do jamek destičky (Koh-I-Noor Hardtmuth nebo Linbro) bylo mikropipetou nanášeno 25 μ l buněčné suspenze, 25 μ l vyšetřovaného séra v příslušné koncentraci a 25 μ l neředěného králíčího komplementu. Destičky byly potom inkubovány 45 minut při teplotě 37 °C.

Zjišťování vitality buněk

Po ukončení inkubace bylo do tří jamek destičky najednou přidáno po 50 μ l 0,2% roztoku trypanové modře (Lachema, n. p., Brno), rozpuštěného v redestilované vodě. Po resuspendování byly buňky přeneseny pod skličko Bürkerovy komůrky a po třech minutách od začátku barvení byly postupně hodnoceny.

Destička s ostatními, dosud nevyhodnocenými vzorky byla mezitím ponechána při teplotě +4 °C.

Hodnocení cytotoxického testu

Při vyhodnocení výsledků byl určen index toxicity (IC), který byl vypočítán podle vzorce (H o n m a aj., 1980):

$$IC = \frac{\frac{\% \text{ živých buněk}}{\text{v buněčné suspenzi}} - \frac{\% \text{ živých buněk}}{\text{v testovaném vzorku}}}{\frac{\% \text{ živých buněk}}{\text{v buněčné suspenzi}}}$$

Hodnotu indexu cytotoxicity 28,4 udávají H o n m a aj. (1980) jako základ při hodnocení výsledků v testu CDAC — podle tohoto vztahu:

hodnota IC < 28,4 → sérum negativní

hodnota IC > 28,4 → sérum pozitivní

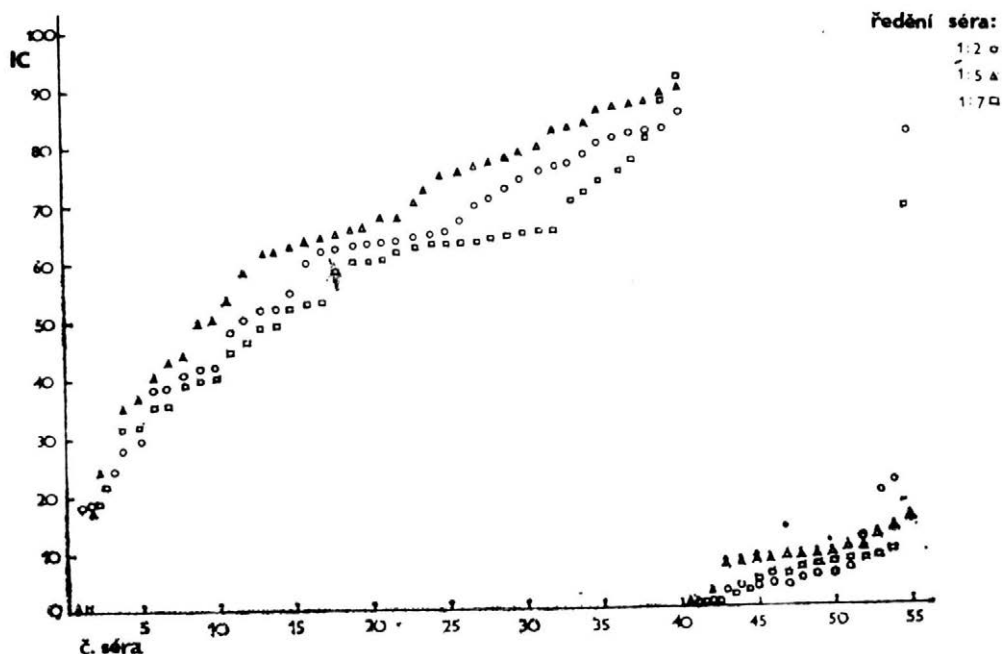
VÝSLEDKY

V 55 vzorcích sér ze stáda silně promořeného bovinní leukózou bylo imunodifúzním testem zjištěno 40 vzorků sér pozitivních na přítomnost protilátek proti BLV, 15 vzorků sér nedávalo žádnou precipitační linii.

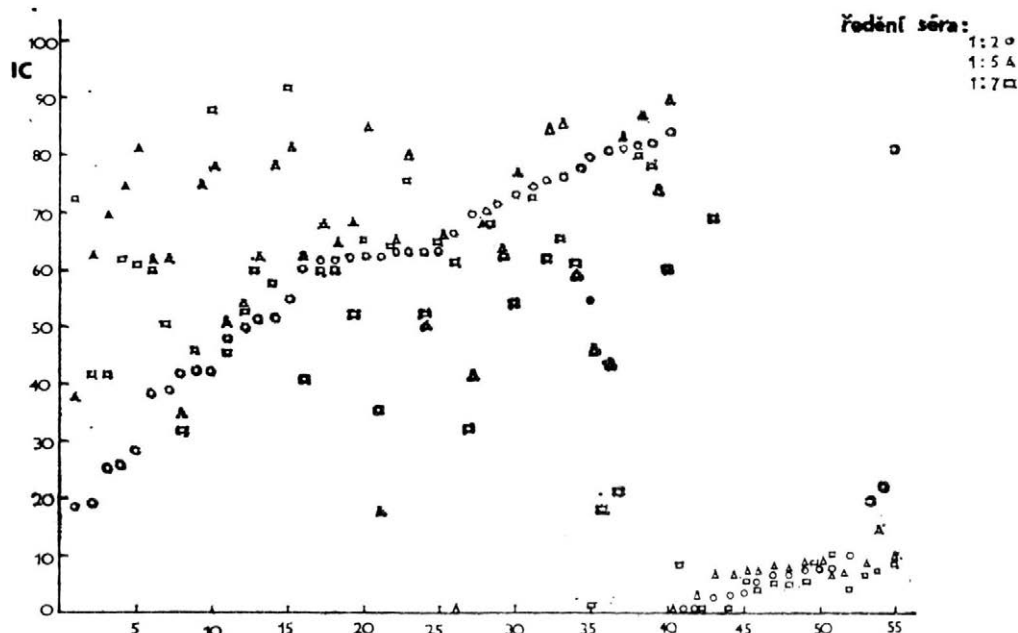
Hodnoty indexu cytotoxicity pro každé ředění vyšetřovaného séra v cytotoxickém testu byly posuzovány ze dvou hledisek:

a) Byl sledován vztah mezi ředěním séra a hodnotou indexu cytotoxicity; výsledky jsou uvedeny v obr. 1.

V každém ředění sér jsou údaje o indexu cytotoxicity seřazeny podle stoupající hodnoty. U pozitivních (č. 1—40) i negativních (č. 41 až 55) vzorků je zřejmé, že k největší lýze buněk většinou dochází v konečné koncentraci séra 1 : 5.



1. Vliv ředění séra na index cytotoxicity — Effect of serum dilution on cytotoxicity index



2. Index cytotoxicity jednotlivých vzorků sér — Cytotoxicity index of different serum samples

b) U každého vzorku byly porovnány hodnoty indexu cytotoxicity v jednotlivých ředěních. V obr. 2 jsou výsledky uspořádány tak, že hodnoty indexu cytotoxicity v ředění 1:2 jsou sestaveny podle postupně se zvyšující hodnoty. Zároveň s nimi jsou pro každý vzorek vyneseny příslušné hodnoty IC v ředění 1:5 a 1:7.

Ze 40 vzorků sér (č. 1—40), které byly pozitivní v ID, mělo 29 vzorků ve všech třech ředěních hodnotu IC větší než 28,4, a tedy i výsledky cytotoxického testu je řadí mezi séra pozitivní. Rozdíly v hodnotách IC v jednotlivých ředěních u těchto 28 sér se pohybují v rozmezí 1,84 až 48,78.

U zbývajících 11 sér z této skupiny vzorků pozitivních v ID jsou rozdíly v hodnotách IC značně větší — pohybují se v rozmezí od 43,86 do 80,61. U všech 11 sér je hodnota IC vždy v jednom ředění menší než 28,4 (což odpovídá sérum negativním) — u pěti vzorků v ředění 1:2, u tří vzorků v ředění 1:5 a u dalších tří vzorků v ředění 1:7. Hodnotami IC ve zbývajících dvou ředěních se tyto vzorky řadí k sérum v cytotoxickém testu pozitivním. Z 15 sér negativních v imunodifúzním testu byla u dvou vzorků hodnota IC v cytotoxickém testu vyšší — u vzorku č. 1 v ředění 1:7 (69,39) a u vzorku č. 13 v ředění 1:2 (82,30); hodnoty IC v ostatních ředěních odpovídaly vzorkům negativním, proto byla zařazena mezi vzorky negativní. U ostatních 13 sér byly hodnoty IC ve všech ředěních pod hodnotou 28,4 (pohybovaly se v rozmezí 4,08 až 22,45).

Z výsledků uvedených v obr. 1 a 2 je zřejmé, že nejvyšší cytotoxicita sér byla v konečném ředění 1:5, nižší hodnoty IC byly zjištěny v ředění 1:2 a nejnižší v ředění 1:7.

Cytotoxický test jsme modifikovali v několika bodech:

1. Cílové buňky

Honma aj. (1980) používali jako cílových buněk v cytotoxickém testu buněk linie FLK (fetal lamb kidney), která je infikována virem BLV a trvale jej produkuje. V této práci bylo použito infikované linie buněk FLS, rovněž trvale produkující virus, který byl prokázán elektronovou mikroskopií (Valíček aj., 1985).

Pro kultivaci buněk FLS se používá médium MEM, doplněné 10 % bovinního fetálního séra. Ve snaze co nejvíce omezit spotřebu tohoto nákladného séra bylo použito bovinní sérum, ze kterého byly imunoglobuliny a nespecifické inhibitory vysráženy působením 10% roztoku PEG 6000. Bylo zjištěno, že mezi buňkami kultivovanými v médiu s fetálním sérem a v médiu s opracovaným bovinním sérem nebyl v cytotoxickém testu rozdíl.

Jestliže byly jako cílové buňky užity FLS pěstované v neupraveném bovinním séru, hodnoty IC v cytotoxickém testu nebyly srovnatelné s výsledky imunodifúzního testu.

Všechny výsledky získané v této práci byly získány na základě zjišťování cytolytických účinků protilátek na buňky FLS, kultivované v médiu s 10% PEG 6000 upraveného bovinního séra.

2. Koncentrace vyšetřovaného séra

Jak již bylo uvedeno, z údajů v obr. 1 a 2 je zřejmé, že největší cytotoxicita byla zjišťována u sér v konečném ředění 1:5. Provedení testu bylo tedy upraveno tak, že vzorky sér byly naředěny pouze na tuto koncentraci a každý vzorek byl nanesen paralelně do tří jamek.

Po zjištění, že u naprosté většiny vzorků byly výsledky ve všech třech jamkách stejné, byl každý vzorek v ředění 1:5 vyšetřován pouze duplicitně.

3. Koncentrace trypanové modře

Při vyhodnocení výsledků v cytotoxickém testu hraje důležitou úlohu koncentrace trypanové modře používané na zjišťování vitality buněk. Watarai aj. (1981) uvádějí koncentraci 0,4 %, Honma aj. (1980) 1,0 %.

V této práci bylo použito koncentrace 0,2 %, neboť v 0,4% i 1,0% roztoku trypanové modře se buňky srážely ve shluky, což velmi znesnadňovalo vyhodnocení — počítání buněk a zjišťování jejich vitality; přitom intenzita zbarvení lyzovaných buněk zůstávala i v nižší koncentraci roztoku trypanové modře stejná.

4. Délka doby barvení

Zjištění vitality buněk, která je určující pro výpočet IC, je výrazně ovlivněno délkou doby barvení buněk trypanovou modří. Roztok trypanové modře proniká do lyzovaných buněk během tří až pěti minut;

po této době jsou buňky dobře vybarvené a rozlišitelné od živých — nezbarvených buněk. Jestliže se barví delší dobu (déle než osm minut), lyzované buňky se začnou rozplývat, nabývají podoby velkých, stále méně zřetelných skvrn a posléze jsou téměř nepostřehnutelné.

Při srovnání výsledků šetření získaných imunodifúzním testem s výsledky získanými testem cytotoxickým jsme ani u jednoho vzorku nezjistili výrazné rozdíly. Přesto není shoda mezi oběma testy zcela jednoznačná, neboť u 11 ze 40 vzorků pozitivních v ID byly vždy v jednom ředění ze tří zjištěny v cytotoxickém testu výsledky negativní, naopak u dvou sér z 15 negativních v ID byla v cytotoxickém testu zjištěna vždy v jednom ředění vysoká cytotoxicita séra.

Tyto rozdíly ve výsledcích mohou být ovlivněny různými faktory:

Mathes aj. (1976) a Sugimoto aj. (1979) uvádějí, že imuno fluorescenčním testem může být detekován specifický glykoprotein na buněčném povrchu asi 80 % cílových buněk. Na tyto povrchové antigeny (což jsou vlastně antigenní determinanty glykoproteinu viru bovinní leukózy) se váží cytotoxické protilátky přítomné ve vyšetřovaných sérech.

Onuma a Olson (1977) zjistili, že u zvířat s bovinní leukózou, která je doprovázena vznikem tumorů, je specifický nádorový buněčný povrchový antigen přítomen v bovinních lymfosarkomových buňkách. Je proto možné, že antigen asociovaný s nádorem (což není strukturní antigen BLV na povrchu cílových buněk užívaných v cytotoxickém testu) může výsledky tohoto testu ovlivnit.

Naproti tomu u zvířat s lymfosarkomem protilátky proti buněčné linii SF-28, což jsou virem bovinní leukémie transformované ovčí fibroblasty, téměř nebyly zjištěny; u krav klinicky zdravých, ale s protilátkami proti BLV, jsou přibližně v polovině případů protilátky proti buňkám SF-28 prokázány (Onuma aj., 1981).

Saney a aj. (1984) uvádějí, že v Japonsku je u 0,1 % populace skotu diagnostikován lymfosarkom, ačkoliv virus BLV byl prokázán u 30 až 50 % klinicky zdravých krav.

Také u nás je bovinní leukóza s výskytem lymfosarkomů velmi vzácná; ani u jednoho z 55 vyšetřovaných zvířat nebyla tato forma onemocnění v době odebrání vzorků zjištěna.

V cytotoxickém testu se zřejmě neuplatňuje jen humorální odpověď v přítomnosti komplementu, mířená proti nádorovému povrchovému antigenu v cílových buňkách. Může zde mít vliv i buňkami zprostředkovaná imunitní odpověď. Je známo, že skot s leukózou má v periferní krvi zvýšené množství B lymfocytů, což může mít vliv na cytotoxický účinek zabíječských buněk (NK — natural killer; NC — natural cytotoxic).

Yamamoto aj. (1984) zjistili, že u krav s perzistující lymfocytózou nebo s lymfosarkomem je cytotoxická aktivita těchto buněk nižší než u zdravého skotu. Zjistili také, že tato cytotoxicita není závislá na makrofázích nebo na T lymfocytech.

Je tedy zřejmé, že i když použití cytotoxického testu v diagnostice leukózy skotu je pouze okrajové, jeho význam při sledování buňkami zprostředkované imunity není zanedbatelný. Proto je vhodné, aby studium tohoto testu pokračovalo.

Literatura

- DURHAM, P. K. J. — SMITH, J. R. — JOHNSON, R. H.: Use of polyethylene glycol treated sera for virus production in cell culture. *J. Virol. Meth.*, 5, 1982, s. 329-334.
- HONMA, T. — ONUMA, M. — SUNEYA, M. — MIKAMI, T. — IZAWA, H.: Cytotoxic antibody in cattle and sheep exposed to bovine leukemia virus. *Arch. Virol.*, 66, 1980, s. 293-299.
- MATHES, L. E. — YOHN, D. S. — HOOVER, E. A. — ESSEX, M. — SCHALLER, J. P. — OLSEN, R. G.: Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. VI. Cytotoxic antibody in cats exposed to feline leukemia virus. *J. Nat. Cancer Inst.*, 56, 1976, s. 1197-1200.
- ONUMA, M. — OLSON, G.: Tumor-associated antigen in bovine and ovine lymphosarcoma. *Cancer Res.*, 37, 1977, s. 3249-3256.
- ONUMA, M. — WATARAI, S. — SUNEYA, M. — MIKAMI, T. — IZAWA, H.: Induction of transformed phenotypes in sheep fibroblasts by culture fluids from cells persistently infected with bovine leukemia virus. *Cancer Res.*, 41, 1981, s. 445-454.
- SUGIMOTO, C. — MIKAMI, T. — SUZUKI, K.: Antigenic dissimilarity of cell surface antigens of two Marek's disease lymphoma-derived cell lines. *Avian Dis.*, 23, 1979, s. 357-365.
- SUNEYA, M. — ONUMA, M. — YAMAMOTO, S. — HAMADA, K. — WATARAI, S. — MIKAMI, T. — IZAWA, H.: Induction of lymphosarcoma in sheep inoculated with bovine leukaemia virus. *J. comp. Path.*, 94, 1984, s. 301-309.
- VALÍČEK, L. — SMÍD, B. — MACHATKOVÁ, M.: Elektronová mikroskopie viru bovinní leukózy (BLV) v buněčné linii fetální jehněčí sleziny. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985, č. 1, s. 37-44.
- WATARAI, S. — ONUMA, M. — MIKAMI, T. — IZAWA, H.: Enhancement of antibody activity to bovine leukaemia virus by complement. *Arch. Virol.*, 68, 1981, s. 135-142.
- YAMAMOTO, S. — ONUMA, M. — KODAMA, H. — MIKAMI, T. — IZAWA, H.: Suppression of natural cytotoxic activity of lymphocytes from cattle and sheep during the progress of bovine leukosis. *Veter. Microbiol.*, 9, 1984, s. 105-111.

Došlo dne 22. 2. 1985

ГРАНАТОВА, М. — КОЗАКОВА, А. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Доказательство наличия цитотоксических антител в сыворотке лейкозного крупного рогатого скота. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985 (8) : 449-456.

На группе 55 образцов сывороток, взятых у быков из сильно пораженного лейкозом стада, проверяли применимость цитотоксического теста в диагностике бовинного лейкоза. Результаты сравнивали с иммунодиффузным тестом в агаре. Оба теста показывают приблизительно одинаковую чувствительность, так как у каждого образца результаты цитотоксического теста отвечали по крайней мере в двух разбавлениях сыворотки из трех (1:2, 1:5, 1:7) иммунодиффузному тесту. Установлено, что для цитотоксического теста годится разбавление 1:5. Обнаружено также, что бовинная фетальная сыворотка, необходимая для роста клеточных культур, может заменяться бовинной сывороткой, обработанной 40% раствором полиэтиленгликоля (PEG) 6000, не влияя при этом на результаты цитотоксического теста.

вирус бовинной лейкемии; цитотоксический тест; иммунодиффузный полиэтиленгликоль 6000; клеточные культуры

GRANÁTOVÁ, M. — KOZÁKOVÁ, A. (Veterinary Research Institute, Brno): *Demonstration of Cytotoxic Antibodies in the Serum of Cattle Suffering from Leukosis*. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985 (8) : 449-456.

In a set of 55 serum samples obtained from the herd of bulls heavily infested with bovine leukosis we tested the applicability of cytotoxic test for the diagnostics of bovine leukosis and compared the results with immunodiffusion test in agar. The two tests show approximately the same sensitivity because in each examined sample the results of cytotoxic test corresponded at least in two out of three

serum dilutions (1:2, 1:5 and 1:7) to the immunodiffusion test. It has been demonstrated that as regards the cytotoxic test, the final serum dilution of 1:5 was satisfying. At the same time it has been checked that the bovine foetal serum, required for the growth of cell cultures, could be replaced by the bovine serum treated with the 40% solution of polyethylene glycol (PEG) 6000 without any influencing the results of cytotoxic test.

virus of bovine leukaemia; cytotoxic test; immunodiffusion test; polyethylene glycol 6000; cell cultures

GRANÁTOVÁ, M. — KOZÁKOVÁ, A. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Nachweis zytotoxischer Antikörper im Serum leukosekranker Rinder*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 449-456.

In einer Gruppe von 55 Serumproben von Bullen aus einer durch bovine Leukose stark befallenen Herde wurde die Anwendbarkeit des zytotoxischen Testes in der Diagnostik der bovinen Leukose geprüft. Die Ergebnisse wurden mit denen des Immunodiffusionstestes im Agar verglichen. Beide Teste weisen ungefähr dieselbe Sensibilität auf, da bei jeder der untersuchten Proben die Ergebnisse im zytotoxischen Test zumindest in zwei von drei Serumverdünnungen (1:2, 1:5, 1:7) dem Immunodiffusionstest entsprachen. Es wurde festgestellt, daß für den zytotoxischen Test eine Endverdünnung des Serums von 1:5 zusagend ist. Gleichzeitig wurde bestätigt, daß bovines Fetalserum, das für das Wachstum von Zellkulturen nötig ist, durch ein mittels 40 %iger Lösung von Polyäthylenglykol (PEG) 6000 bearbeitetes bovines Serum ersetzt werden kann, ohne daß dadurch Ergebnisse des zytotoxischen Testes beeinträchtigt werden.

Virus der bovinen Leukose; zytotoxischer Test; Immunodiffusionstest; Polyäthylenglykol 6000; Zellkulturen

Adresa autorů:

RNDr. Marta Granátová, MVDr. Alexandra Kozáková, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

DIAGNOSTIKA OSTEOPATIÍ U SKOTU METODOU KOSTNÍ BIOPSIE

J. Marek, J. Meisl

MAREK, J. — MEISL, J. (SVÚ — veterinární nemocnice, Hranice): *Diagnostika osteopatií u skotu metodou kostní biopsie*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 457-465.

Biochemickou analýzou a rentgenograficky jsme vyšetřili 70 vzorků kostních biopátů od 70 krav. Biochemickým vyšetřením kostních biopátů odebraných z *tuber coxae* byl zjištěn osteoporotický proces u 87 % vyšetřených dojníc, osteomalatický proces u 57 % a smíšená forma, tj. osteoporóza/osteomalacie u 51,4 % vyšetřených dojníc. Podle distribuce nálezů ve vztahu k fázím reprodukčního cyklu je četnost patologických nálezů nejvyšší u otelených krav. Vyšetřením popela na obsah osteotrofických minerálů, vápníku a fosforu, byla zjištěna fyziologická relace jen u 5,7 % dojníc, rozšířený poměr u 87,2 % a zúžený u 7,1 % dojníc. Srovnáním biochemického nálezu s nálezem rentgenografickým jsme zjistili o 23 % nižší rozdíl v zachytu patologických případů u rentgenologické metody. Metody rentgenologického vyšetření kostních biopátů lze využít jako screening v diagnostice metabolických osteopatií.

osteoporóza; osteomalacie; rentgenologické vyšetření; biochemické vyšetření

První zprávy o diagnostickém využití kostní biopsie ve veterinárním lékařství pocházejí od Graebnera (1961), jehož metodu dále rozpracoval Priboth (1966) a u nás Jagoš aj. (1975). Vycházejíce z citovaných autorů rozhodli jsme se zavést a v terénních podmínkách v oblasti působení našeho pracoviště — v Severomoravském kraji — ověřit diagnostiku metabolických osteopatií metodou kostní biopsie.

Obtížnost diagnostiky osteopatií vyplývá z faktu, že metabolické osteopatie probíhají u skotu zpravidla dlouhou dobu latentně, bez zjevné klinické manifestace. Dosavadní způsob diagnostiky klasickým vyšetřením tělních tekutin — krevního séra a moče — je již obecně považován za málo průkazný. Hladiny vápníku a fosforu v krevní plazmě nepodávají věrný obraz o úrovni mineralizace kostry. Intravitální vyšetření kostní tkáně pomocí kostní biopsie umožňuje exaktněji a dokonaleji posoudit úroveň mineralizace kostní tkáně, metabolismu osteotrofických minerálů vápníku a fosforu, a tím umožňuje diferenciální diagnostiku metabolických osteopatií.

Význam stanovení mineralizace kostní tkáně vyplývá z toho, že tato tkáň představuje hlavní depozitní orgán a zásobárnu vápníku a fosforu pro případ, kdy je potřeba tyto prvky mobilizovat. Ve skeletu je uloženo 98 % veškerého vápníku a 80 až 90 % veškerého fosforu v těle. Izotopovou metodou (Sova aj., 1978) bylo zjištěno, že vstřebaný vápník se nejprve ukládá do kostní tkáně a odtud se pak přesunuje do

krve a tkání podle aktuálních potřeb organismu. Z tohoto hlediska je velmi závažná mobilizace vápníku do mléka u dojnic v laktaci. Předpokládá se, že 25 až 30 % vápníku v kostní tkáni je ve formě labilních, uvolnitelných sloučenin. Podle nových poznatků, získaných radioizotopovou metodou (Procházková aj., 1980), pochází vápník obsažený v mléce z 80 až 90 % ze zásob v kostní tkáni a fosfor zhruba z 50 %. To naznačuje značný pohyb těchto prvků a jejich vysokou potřebu při tvorbě mléka u dojnic v průběhu laktace, zejména ve fázi jejího nástupu a kulminace.

O intravitální vyšetření stupně mineralizace kostní tkáně se již dříve snažili Priboš (1966) a Šarabrin (1975), a to metodou rentgenologického vyšetření ocasních obratlů. Tato metoda se však v praxi neujala, protože podmínky vyšetření byly nestandardní. Velikost ocasních obratlů je u jednotlivých zvířat značně variabilní a získané výsledky jsou těžko hodnotitelné.

Chemické vyšetření kostní tkáně umožňuje posoudit stav mineralizace kostní tkáně a metabolismu vápníku a fosforu. Biochemickou metodou lze určit obsah popela v tukuprosté sušině kostní tkáně (TPS), obsah popela v jednotce objemu (mg popela v 1 cm³), obsah jednotlivých minerálů (vápníku, fosforu a hořčíku) a vyjádřit jejich vzájemnou relaci. Kromě toho umožňuje i případné toxikologické vyšetření na přítomnost cizorodých látek, např. těžkých kovů (olovo, kadmium, rtuť, zinek). Laboratorní biochemické vyšetření kostních biopátů je však časově, pracovní a energeticky dost náročné. Naskytá se možnost jednoduššího orientačního vyšetření kostních biopátů, a to vyšetření fyzikálně-rentgenologické (Marek, 1982). Tento způsob je časově méně náročný, vyžaduje však rtg přístroj. Rentgenologickým vyšetřením lze hodnotit densitu trámčů kostní spongiózy, které odpovídá obsah minerální složky — popela v 1 cm³ kostní tkáně, ale není možné posoudit vzájemnou relaci mezi vápníkem a fosforem. Rentgenologické vyšetření kostních biopátů umožňuje diagnostikovat především procesy osteoporózy, méně již osteomalacie.

Pojem osteoporóza vyjadřuje celkový úbytek hmoty jak minerální, tak i organické složky na jednotku objemu, u osteomalacie se jedná pouze o úbytek minerální složky. Ukazatelem charakterizujícím spongiózu je tedy obsah popela v jednotce objemu (mg · cm⁻³), u osteomalacie je ukazatelem obsah popela v jednom gramu TPS. Pouhé stanovení obsahu popela v TPS je z hlediska stanovení osteoporózy nedostatečné, neboť poměr mezi anorganickou a organickou složkou kosti nemusí být změněn (Doubek aj., 1982).

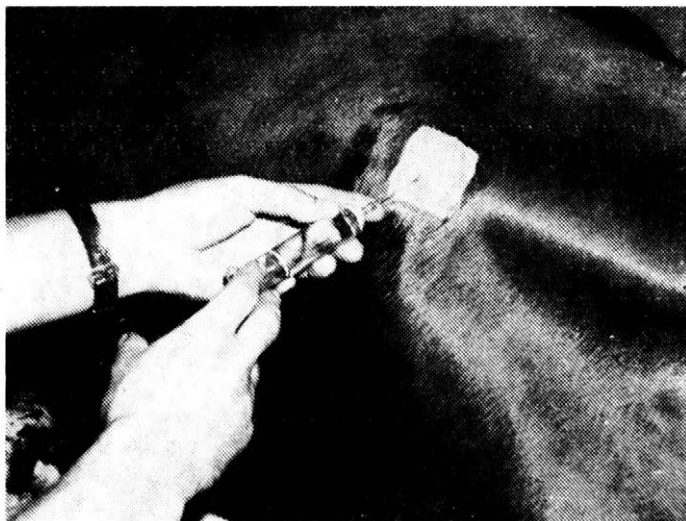
MATERIÁL A METODA

V zimním období roku 1983/84 jsme vyšetřili kostní biopáty v pěti chovech dojnic. Průměrná roční dojivost činila 3500 až 4000 litrů, věk dojnic byl čtyři až pět let. Dva chovy byly v řepářské, dva v bramborářské a jeden v podhorské (pastvinářské) výrobní oblasti. Celkem bylo vyšetřeno 70 dojnic se zastoupením tří skupin podle fáze reprodukčního cyklu.

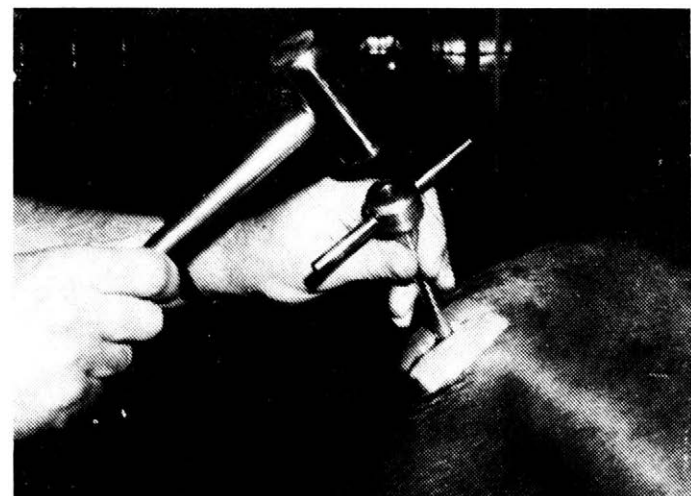
Technika odběru vzorků kostní tkáně (spongiózy) spočívala v přípravě operačního pole v krajině *tuber corae*, v infiltrační anestezii, incizi kůže a ve vlastním odběru kostní tkáně kostním trokarem (obr. 1—3).

Získané biopáty jsme vyšetřovali rentgenologicky (rentgenograficky) a biochemicky.

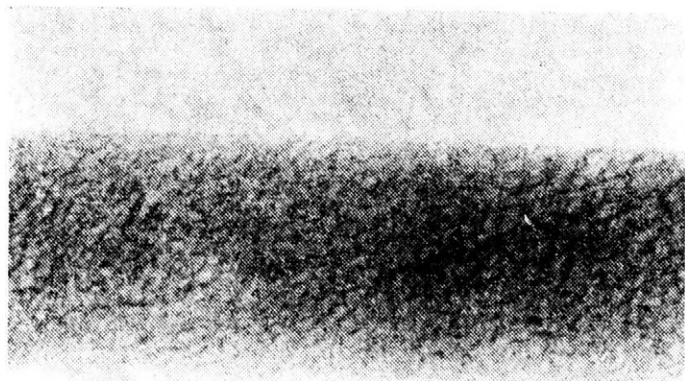
1. Lokální infiltrační
anestezie — Local in-
filtration anaesthesia



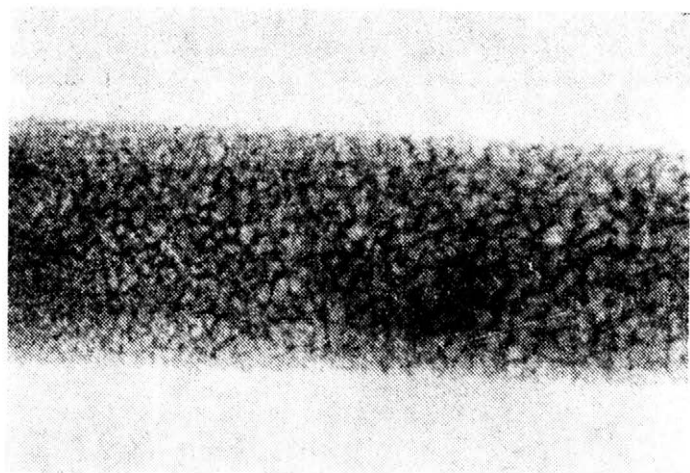
2. Incize kůže — Skin
incision



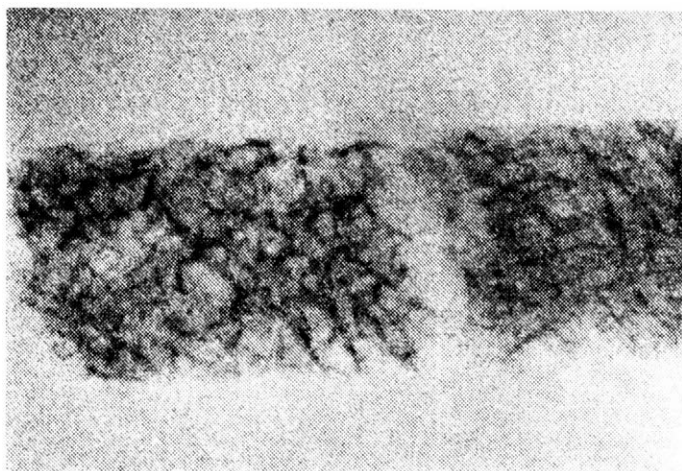
3. Odběr kostní tkáně
— Bone tissue sampling



4. Rtg snímek kostního bioptátu (zvětšeno) — fyziologický standard 220 mg.cm⁻³ — Radiograph of bone bioptate (enlarged) — physiological standard 220 mg.cm⁻³



5. Rtg snímek kostního bioptátu (zvětšeno) — patologický standard 185 mg.cm⁻³ — Radiograph of bone bioptate (enlarged) — pathological standard 185 mg.cm⁻³



6. Rtg snímek kostního bioptátu (zvětšeno) — patologický standard 157 mg.cm⁻³ — Radiograph of bone bioptate (enlarged) — pathological standard 157 mg.cm⁻³

Kostní biopťáty jsme snímkovali malým přenosným rentgenovým přístrojem značky Arman o stabilním výkonu 75 kV a 18 mA na rtg filmy značky MEDIX. Denzitu trámčů kostní spongiózy jsme vyhodnocovali komparací se standardními vzorky biopťátů o známém obsahu popela v 1 cm³ (obr. 4—6).

Biochemické vyšetření kostních biopťátů spočívalo v extrakci tuku, seříznutí biopťátů na standardní objem, sušení, následné mineralizaci při teplotě 550 °C po dobu 48 hodin a v kvantitativním stanovení minerálů v popelu. Vápník a hořčík jsme stanovovali metodou plamenové atomové absorpční spektrofotometrie, fosfor kolorimetrickou metodou podle Urbach-Raabeho. Hodnoty popela jsou vypočteny a uvedeny v mg.g⁻¹ TPS a v mg.cm⁻³. Dále jsme stanovili obsah jednotlivých minerálních látek (vápníku, fosforu a hořčíku) v popelu a vzájemnou relaci vápníku a fosforu. Získané výsledky jsme hodnotili na základě fyziologické normy, stanovené histologickým vyšetřením (Černý, 1977). Za fyziologickou hodnotu obsahu popela v jednom gramu TPS jsme považovali 600 mg a výše, u obsahu popela na jednotku objemu 220 mg v 1 cm³ a výše. Za fyziologický poměr vápníku a fosforu jsme považovali hodnotu 1,66.

VÝSLEDKY

Přehled o získaných výsledcích biochemického a rentgenologického vyšetření kostních biopťátů od 70 dojnic z pěti chovů je uveden v tab. I až IV.

Biochemickým vyšetřením kostních biopťátů byl zjištěn patologický (snížený) obsah popela v objemu, tj. osteoporotický proces, u 87 % krav, snížený obsah popela v 1 g TPS, tj. osteomalatický proces, u 57 % dojnic, smíšená forma, tj. osteoporóza/osteomalacie, u 51,4 % dojnic. Z vyšetřených chovů jsme v chovu P.n.O., ve kterém jsou nejnižší průměry hodnot obsahu popela i četnosti patologických hodnot, pozorovali již začínající klinický syndrom, svědčící o osteopatii (nefyziologické postoje, obtížné vstávání, přešlapování apod.). V ostatních chovech jsme klinické příznaky osteopatie nepozorovali.

U relace mezi vápníkem a fosforem v popelu kostní tkáň silně převažoval rozšířený poměr [nad hodnotu 1,66] — byl zjištěn u 87,2 % dojnic; u 7,1 % dojnic byl poměr zúžený a pouze u 5,7 % vyšetřených dojnic byl optimální.

Pokud jde o distribuci hodnot u dojnic ve vztahu k fázím repro-

I. Přehled nálezů zjištěných biochemickým a rentgenologickým vyšetřením — Review of findings from biochemical and radiographic examination

Nález	Popel		rtg nález
	mg/cm ³	mg/g TPS	
Fyziologický	13 % krav	43 % krav	35 % krav
Patologický (snížený)	87 % krav	57 % krav	65 % krav

II. Poměr vápníku a fosforu v popelu z počtu všech vyšetřených dojnic — Calcium : phosphorus ratio in ash of all examined dairy cows

Zúžený (pod 1,66) 7,1 %	Normální (1,66) 5,7 %	Rozšířený (nad 1,66) 87,2 %
----------------------------	--------------------------	--------------------------------

III. Hodnocení nálezů obsahu popele u dojnic podle fáze reprodukčního cyklu —
Evaluation of findings of ash content in dairy cows according to the phase of re-
production cycle

Fáze cyklu	Popel	
	mg/cm ³	mg/g TPS
Nízkobřeží	23,3 % snížených	16,6 % snížených
Vysokobřeží	21,6 % snížených	16,6 % snížených
Otelené	26,6 % snížených	20,0 % snížených

IV. Nález biochemických ukazatelů ze dvou chovů rozdílných výrobních oblastí —
Biochemical values obtained from two herds in different production areas

Chov	Popel		Ca : P
	mg/cm ³	mg/g TPS	
P. n. O.	celkem průměr	161	1,82
	počet snížených	94 %	
	s průměrem	150	
M. B.	celkem průměr	250	1,88
	počet snížených	27 %	
	s průměrem	185	

dukčního cyklu, je u obou ukazatelů, tzn. u popele v objemu a v TPS, nejvyšší četnost patologických nálezů u skupiny krav otelených.

Markantní rozdíl v ukazatelích se projevuje mezi chovem P.n.O. (vysoká mléčná užitkovost) v řepařské výrobní oblasti a chovem dojnic v M.B. (rovněž vysoká mléčná užitkovost) v podhorské — pastvinářské výrobní oblasti (tab. IV).

Při porovnání výsledků získaných biochemickým vyšetřením s nálezy získanými rtg vyšetřením a vizuálně hodnocenými je rozdíl v zachytu patologických případů u rtg metody o 23 % nižší (vztahuje se na obsah popele na objem).

DISKUSE

Z výsledků vyšetření vyplývá, že subklinicky probíhající osteopatie u dojnic budou zřejmě i v Severomoravském kraji dost rozšířeny. Vzhledem k malému počtu vyšetřených stád a zvířat nemůžeme výsledek zevšeobecnit. Domníváme se však, že i tato malá sonda nás opravňuje vyslovit názor, že výskyt subklinických metabolických osteopatií, a to převážně osteoporózy, bude v našich chovech dojnic dost vysoký, což odpovídá i nálezům, k nimž dospěli J a g o š aj. (1981). Vzhledem ke

zjištěným nálezům a k vzestupnému trendu v mléčné užitkovosti v chovech dojnic by se této problematice měla věnovat náležitá pozornost.

Ilustrativní je srovnání nálezu mezi chovy v P.n.O. a M.B., při němž vyniká diametrální rozdíl mezi sledovanými parametry. V chovu P.n.O. v řepařské výrobní oblasti byl zjištěn nejvyšší obsah popela co do intenzity i extenzity v 1 g TPS, zejména obsah popela v 1 cm³. V tomto chovu již byl u některých dojnic pozorován klinický syndrom, svědčící o osteopatii. Příčinu tohoto jevu spatřujeme v charakteru a typu výživy, protože po převážnou část roku tvoří podstatnou část objemu krmných dávek řepné siláže s malým podílem sena, a dále i v technologii chovu (trvalý stájový chov bez výběhu, pastvy a bez přístupu slunečních paprsků). Acidogenní účinek krmné dávky potencuje demineralizaci kostní tkáně a vznik osteopatií.

Naopak v chovu dojnic M.B. v podhorské — pastvinářské výrobní oblasti biochemický nález téměř odpovídal fyziologickým parametrům. Příčinu tohoto příznivého nálezu spatřujeme v odlišném typu a charakteru výživy — v zimních krmných dávkách převažuje z objemných krmiv luční seno, senáž, popřípadě i okopaniny — dále pak i v rozdílné technologii chovu, tj. především v pastvě. Je známo, že kvalitně usušené seno je hlavním přirozeným zdrojem vitamínu D ve výživě skotu. Sluneční záření s UV paprsky transformuje po pokosení zelené píče při jejím sušení rostlinný provitamin ergosterol na vitamín D — kalciferol. V živých rostlinných buňkách konverze ergosterolu ve vitamín D ergokalciferol neprobíhá. Siláže často obsahují jen nepatrné množství vitamínu D (Kolb, [1980]). UV paprsky u pasoucích se zvířat aktivizují provitamin 7-dehydrocholesterol v kůži na aktivní cholekalciferol, který příznivě ovlivňuje metabolismus osteotrofických minerálních látek, a tím i proces osifikace kostní tkáně. Zároveň pohyb na pastvě podporuje vývoj a růst kostry zvířat. Rozdílný nález mezi těmito chovy potvrzuje, že důležitým faktorem pro fyziologický vývoj kostry a fyziologický stav kostí je nejen vlastní výživa, včetně optimálního přívodu minerálních látek v krmné dávce, ale také technologie chovu.

Ze zjištění, že u 87,2 % dojnic je poměr vápníku a fosforu rozšířen nad hodnotu 1,66, vyplývá, že v naší oblasti (Severomoravský kraj) je ve výživě dojnic u osteotrofických minerálních látek deficit fosforu a přebytek vápníku, což odpovídá i nálezům profilového metabolického testu v chovech dojnic z našeho dlouhodobého sledování.

Z metabolických osteopatií převažuje výskyt osteoporózy (u 87 % vyšetřených dojnic), méně se vyskytují osteomalacie (57 %) a smíšené formy (51,4 %).

Pokud jde o vlastní techniku a provedení biopsie, můžeme konstatovat, že i když se nezasvěcenému tato metoda může na první pohled zdát v běžné klinické praxi těžko proveditelná, podle našich zkušeností je i v terénních podmínkách dobře realizovatelná. Nevyžaduje náročnější nebo speciální způsob fixace zvířat ani speciální technické zařízení. Po lokální anestezii neprojevovala zvířata výraznější obrannou reakci na bolestivost. Zárok, včetně přípravy místa biopsie, anestezie a dalších přípravných prací, trvá u jednoho zvířete cca 15 minut, ale času potřebného k nástupu anestezie se může využít k přípravě dalších zvířat, a tak lze postupovat sériově. K fixaci zvířete plně postačují dva pomocníci: jeden fixuje zvíře za mulec, druhý za ohon. Přesto, že jsme nedělali suturu incidované kůže, hojení probíhalo *per primam*.

Při hodnocení rentgenologického snímku je nutné počítat s určitou subjektivní chybou, obtížné je přesně detekovat marginální patologické nálezy v blízkosti dolní fyziologické hranice. Erudovaný a zkušený interpretátor rtg snímků může detekovat začínající osteopatii (osteoporózu) s obsahem popela přibližně od $200 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ a níže. Tento práh detekce pro rychlou orientaci v terénních podmínkách pomocí malých přenosných rtg přístrojů postačuje. Popsaná metoda rtg vyšetření kostních biopátů může sloužit jako screening. V případech pozitivních nálezů je indikováno hlubší biochemické, popř. i histologické vyšetření.

Z hlediska předpokládaného rozšíření subklinických osteopatií v chovech dojníc, zvláště vysokoprodukčních, považujeme za potřebné a účelné zavést metodu kostní biopsie do běžné diagnostické praxe, především v indikovaných případech.

Intravitální biopsie umožňuje respektovat zásady pro reprezentativní výběr zvířat, který odpovídá profilu stáda. Umožňuje bezprostředně využít výsledků k zavedení léčby a preventivních opatření ve výživě zvířat. Postmortální odběr nekropsií, i když je technicky snazší, neumožňuje získat výsledky od reprezentativního souboru zvířat. Při výběru zvířat k vyšetření metodou kostní biopsie je nutné respektovat věk dojníc z hlediska důležitosti kritéria ukončení procesu osifikace kostry.

Literatura

- ČERNÝ, H.: Hodnocení morfologické struktury v kostních biopátech skotu vzhledem k poruchám minerálního metabolismu. [Habilitační práce.] Brno 1977. 131 s. — Vysoká škola veterinární.
- DOUBEK, J. — JAGOŠ, P. — ILLEK, J.: Využití kostní biopsie v diagnostice metabolických osteopatií dojníc. Veterinářství, 32, 1982, s. 454-456.
- GRAEBNER, R.: Die Knochenpunktion beim Rind. Technik und Instrumentarium. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 74, 1961, s. 253.
- JAGOŠ, P. a kol.: Výzkum karencí minerálních látek při metabolických poruchách. [Závěrečná zpráva VÚVL II-4/5.] Brno, Vysoká škola veterinární 1975.
- JAGOŠ, P. a kol.: Studium poruch metabolismu makroelementů a mikroelementů u skotu v podmínkách velkovýrobních technologií. [Závěrečná zpráva dílčího výzkumného úkolu VI-6-4/8.] Brno, Vysoká škola veterinární 1981.
- KOLB, E.: Biochemie und Pathobiochemie der Haustiere. Leipzig, S. Hirzel Verlag 1980. 416 s.
- MAREK, J.: Využití rtg vyšetření kostních biopátů v diagnostice osteopatií u krav. [Písemná atestační práce.] Brno, Vysoká škola veterinární 1982.
- PRIBOTH, W.: Zur Methode der röntgenologisch-photometrischen Bestimmung des Aschegehaltes im Knochen beim Rind. Zbl. Veter.-Med., R. A, 13, 1966, s. 629-644.
- PROCHÁZKA, Z. — JAGOŠ, P. — ILLEK, J.: Užití některých makroprvků u skotu při definované krmné dávce. [Závěrečná zpráva dílčího výzkumného úkolu VI-6-4/9.] Brno, Vysoká škola veterinární 1980.
- SOVA, Z.: Fyziologie hospodářských zvířat II. Praha, Vysoká škola zemědělská 1978.
- ŠARABRIN, I. G.: Profilaktika narušení obmena věščestv u krupnovo rogatovo skota. Moskva, Kolos 1975. 334 s.

Došlo dne 22. 12. 1984

МАРЕК, Я. — МАЙСЛ, Й. (ГВИ — ветеринарная больница, Границе): Диагностика остеопатии у крупного рогатого скота с помощью костной биопсии. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 457-465.

S pomocí biochemického analýzy a rentgenografie išľedovali 70 obrazcov kostných biopátov u 70 kráv. Biochemické išľedovanie kostných biopátov išľ *tuber coxae* ukázalo na osteoporotický proces u 87 % išľedovaných kráv, osteomalatický

процесс у 57 % и смешанную форму остеопороз/остеомаляция) у 51,4 %. Как показывает распределение диагнозов по фазам воспроизводительного цикла, частота патологических случаев наибольшая у отелившихся коров. Путем исследования зольного вещества на остеотрофические минералы, кальций и фосфор установлена физиологическая увязка лишь у 5,7 % коров, расширенное соотношение — у 87,2 %, а суженное — у 7,1 % коров. Путем сопоставления биохимического диагноза с рентгенографическим установлена на 23 % более низкая разница в задержании патологических случаев по второму методу. По методам рентгенологического исследования костных биоптатов можно проводить скрининг в диагностировании метаболических остеопатий.

остеопороз; остеомаляция; рентгенологическое исследование; биохимическое исследование

MAREK, J. — MEISL, J. (State Veterinary Institute — Veterinary Hospital, Hranice): *Diagnostics of Osteopathies in Cattle by the Method of Bone Biopsy*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 457-465.

Seventy samples of bone biotates from 70 cows were examined by the biochemical analysis and radiographically. By biochemical examination of bone biotates taken from the *tuber coxae* we demonstrated the osteoporotic process in 87 % of examined dairy cows, the osteomalacic process in 57 % and the combined form, i. e. osteoporosis/osteomalacia in 51.4 % of examined dairy cows. According to the distribution of findings in relation to the phases of reproduction cycle, the frequency of pathological findings was found to be highest in cows after calving. The examination of ash for the content of osteotrophic minerals, calcium and phosphorus, has demonstrated the physiological relation in 5.7 % of dairy cows only, widened ratio in 87.2 % and reduced one in 7.1 % of dairy cows. By a comparison of the biochemical finding with the radiographic one we have revealed the difference, by 23 % lower, in identification of pathological cases by the radiographic method. The method of radiographic examination of bone biotates can be used as screening in the diagnostics of metabolic osteopathies.

osteoporosis; osteomalacia; radiographic examination; biochemical examination

MAREK, J. — MEISL, J. (Staatliches veterinärmedizinisches Institut — Tierklinik, Hranice): *Diagnostik der Osteopathien beim Rind mittels Knochenbiopsie*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 457-465.

Mittels biochemischer Analyse und röntgenographisch untersuchten wir 70 Knochenbiopiatproben von 70 Kühen. Durch biochemische Untersuchung der aus *Tuber coxae* entnommenen Knochenbiopiate wurde bei 87 % der untersuchten Kühe ein osteoporotischer Prozeß, bei 57 % ein osteomalatischer Prozeß und bei 51,4 % eine Mischform, d. h. Osteoporose/Osteomalazie, festgestellt. Die Häufigkeit der pathologischen Befunde, ihrer Distribution in bezug auf die Phasen des Reproduktionszyklus nach, ist bei abgekalbten Kühen am höchsten. Aufgrund von Untersuchungen der Asche auf den Gehalt an osteotrophischen Mineralen, d. h. Kalzium und Phosphor, wurde eine physiologische Relation nur bei 5,7 % der Kühe ermittelt, während 87,2 % eine erweiterte und 7,1 % eine verengte Relation aufwiesen. Ein Vergleich der biochemischen mit den röntgenographischen Befunden ergab, daß bei der röntgenologischen Methode ein um 23 % geringerer Unterschied der erfaßten pathologischen Fälle verzeichnet wurde. Die Methode der röntgenologischen Untersuchung kann als Screening in der Diagnostik metabolischer Osteopathien angewandt werden.

Osteoporose; Osteomalazie; röntgenologische Untersuchung; biochemische Untersuchung

Adresa autorů:

MVDr. Jan Marek, MVDr. Jiří Meisl, SVÚ — veterinární nemocnice, Fierlingerova 1444, 753 24 Hranice na Moravě

STANOVENÍ POČTU SOMATICKÝCH BUNĚK V MLÉCE RYCHLOU DIFENYLAMIN DNA FILTR METODOU

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

ŠEDINOVÁ, V. — URBANOVÁ, E. — ŠKARDA, J. — JUKL, A. (Ústav fyziologie a genetiky hospodářských zvířat ČSAV, Praha): *Stanovení počtu somatických buněk v mléce rychlou difenylamin DNA filtr metodou*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 467-475.

Rychlá reakce difenylaminového činidla s DNA byla použita pro stanovení počtu somatických buněk v mléce dojníc pomocí DNA filtr metody. Metoda je založena na filtraci zahřáté (65—70 °C) směsi mléka s Tritonem X-100 přes nitrocelulózový membránový filtr Synpor o velikosti pórů 2 až 5 μm a na následném stanovení DNA zachycených somatických buněk pomocí barevné reakce difenylaminu. K membránovému filtrům se zachycenými somatickými buňkami se přidají 2 ml destilované vody a 4 ml difenylaminového činidla. Směs se zahřívá 20 minut ve vodní lázni při teplotě 90 až 100 °C, zchladí, zcentrifuguje (3500 $\times$ g, 15 min) a změří se optická denzita při 595 nm. Pro převod obsahu DNA na počet buněk bylo použito vztahu 8 μg = 1 milión buněk. Průměrný variační koeficient stanovení činil 5,9 % a korelační koeficient mezi metodou difenylamin DNA filtr a přímou mikroskopií somatických buněk na membránových filtrech byl $r = 0,997$. Difenylamin DNA filtr metodou je možné stanovit počet buněk i ze vzorků mléka uložených ve zmrazeném stavu nebo z filtrů se zachycenými buňkami, uložených při teplotě 4 °C (10 dní) nebo 25 °C (3 dny). Ke stanovení je možné použít i mléko stabilizované formaldehydem, jestliže je uloženo při teplotě 4 °C.

mléko; somatické buňky; stanovení; DNA filtr metoda; membránové filtry

V mléce dojníc se vyskytují dva typy buněk. Jsou to epiteliální buňky mléčné žlázy a leukocyty z krve. Až donedávna se tradovalo, že počet epiteliálních buněk je fyziologicky zvýšen na začátku a ke konci laktace (Schalm aj., 1971). V posledních letech však bylo elektronovou mikroskopií zjištěno, že počet epiteliálních buněk v mléce dojníc nepřesahuje — bez ohledu na stadium laktace — 2 % z celkového počtu somatických buněk (Lee aj., 1980; Paape aj., 1981). Počet somatických buněk v mléce je proto dobrým ukazatelem zdraví vemene.

Klasická metoda mikroskopického stanovení počtu buněk v nátěru vzorků mléka na skle je velmi pracná a nepřesná. Hledaly se proto přesnější a rychlejší způsoby, jak somatické buňky počítat. V současné době se ve velkých laboratořích tato stanovení dělají elektronicky pomocí celloskopů metodou založenou na počítání partikulí nebo pomocí fosomatiků metodou založenou na fluorooptickém stanovení buněk obarvených fluorescenčními barvivami specifickými pro DNA. Pořizovací cena uvedených přístrojů je však vysoká, provoz i údržba velmi nákladné. Da-

leko levnější, rychlý a dostatečně přesný způsob stanovení počtu somatických buněk v mléce vyvinuli Hutjens aj. (1970). Jejich metoda je založena na kolorimetrickém stanovení DNA somatických buněk, zachycených na membránovém filtru po filtraci směsi mléka s Tritonem.

Cílem předložené práce bylo studium použití membránových filtrů naší výroby a rychlé difenylaminové metody pro stanovení počtu somatických buněk v mléce dojníc.

MATERIÁL A METODY

MATERIÁL

Vysoce polymerizovaná sodná sůl deoxyribonukleové kyseliny z brzlíku telat, akridinová žluť, auramin, zlepšené Giemsovo barvivo (Improved Giemsa stain R66-GURR), substance Giemsa stain GURR a difenylamin byly zakoupeny u firmy BDH Chemicals Ltd., England. V některých pokusech byl také použit difenylamin firmy Spolana, Neratovice. Difenylamin obou firem byl přečištěn rekrystalizací z vroucího hexanu. Triton X-100 byl zakoupen od firmy Koch-Light Ltd., England. Nitrocelulózy membránové filtry Synpor 1, 2 a 3 o průměru 24 mm byly získány z n. p. Labora, Praha nebo z n. p. Zdravotnické zásobování, Praha. Použitě celoskleněné filtrační zařízení bylo popsáno v naší předchozí práci (Urbanová aj., 1985).

MLÉKO

K pokusům byly použity čtvrtkové vzorky mléka zdravých i mastitidních dojníc v různém stadiu laktace. Odběr, příprava a filtrace vzorků mléka byly již popsány (Urbanová aj., 1985). Filtrujeme obvykle pět, popřípadě i více mililitrů mléka.

STANOVENÍ DNA SOMATICKÝCH BUNĚK ZACHYCENÝCH NA MEMBRÁNOVÝCH FILTRECH BAREVNOU REAKCÍ S DIFENYLAMINEM

Filtry se zachycenými somatickými buňkami byly přeneseny do zkumavek, do kterých byly přidány 2 ml destilované vody a 4 ml čerstvě připraveného difenylaminového činidla (Dische, 1955), složeného z 1 g difenylaminu, 100 ml kyseliny octové p. a. a 2,75 ml koncentrované kyseliny sírové p. a.

Zkumavky byly po protřepání a překrytí kónickými skleněnými chladiči (Urbanová aj., 1985) zahřívány 20 minut ve vroucí vodní lázni. Současně byly s difenylaminovým činidlem a destilovanou vodou považeny samotné filtry promyté Tritonem X-100 a fyziologickým roztokem, které sloužily jako slepý pokus, a stejným způsobem ošetřené filtry s 10 až 100 μg DNA, které sloužily jako standardy. Po zchlazení byly vzorky, slepé pokusy i standardy přelity do centrifugačních zkumavek a centrifugovány při 3500 $\times$ g po dobu 15 minut. Z odstředěných vzorků byla odsáta povrchová blanka a optická denzita byla měřena na spektrofotometru Spekol (Zeiss, Jena, NDR) nebo na spektrofotometru Spektromom (MOM, Budapest, MLR) při 595 nm.

PŘÍPRAVA STANDARDŮ

Zásobní roztok DNA připravíme rozpuštěním DNA v destilované vodě (500 μg . ml⁻¹). Tento roztok je skladován při teplotě -20 °C. Standardy připravujeme rozpipetováním zásobního roztoku DNA do zkumavek s promytými filtry takto:

40 μl zásobního roztoku DNA + 1960 μl destilované vody =	10 μg DNA . ml ⁻¹
100 μl zásobního roztoku DNA + 1900 μl destilované vody =	25 μg DNA . ml ⁻¹
200 μl zásobního roztoku DNA + 1800 μl destilované vody =	50 μg DNA . ml ⁻¹
400 μl zásobního roztoku DNA + 1600 μl destilované vody =	100 μg DNA . ml ⁻¹

STANOVENÍ POČTU SOMATICKÝCH BUNĚK V MLÉCE INDOL DNA FILTR METODOU

Stanovení DNA somatických buněk mléka zachycených na membránových filtrech barevnou reakcí s indolem bylo provedeno podle Urbanové aj. (1985).

STANOVENÍ SOMATICKÝCH BUNĚK MLÉKA PŘÍMOU MIKROSKOPIÍ NA FILTRU

K přímé mikroskopii somatických buněk zachycených na membránových filtrech (Synpor 2 nebo 3) bylo použito postupu, který uvedla Šedínová aj. (1984). Bylo zjištěno, že Výrobna léčivých přípravků, n. p. Zdravotnické zásobování, používá substancí Giemsova barviva od různých dodavatelů, z nichž některé srážejí vzorky mléka v průběhu barvení. Podle Duitschaevera a Leggatta (1967) je nejvhodnějším Giemsovým barvivem Improved Giemsa Stain R66-GURR (BDH Chemicals Ltd., England). Roztok dobře barvicího Giemsova barviva lze také připravit ze substance Giemsa Stain-GURR (BDH Chemicals Ltd., England) takto:

Ke 3 g Giemsovy substance přidáme 416 g glycerolu, důkladně promícháme a zahřejeme na vodní lázni (56 °C) po dobu 90 až 120 minut. Pak přidáme 416 g metanolu, opět důkladně promícháme a necháme stát při pokojové teplotě sedm dní. Roztok barviva zfiltrujeme nejprve přes filtrační papír Filtrak 389, potom přes membránový filtr Synpor 3. Barvení somatických buněk probíhá ve směsi mléka (100–300 μ l) a Tritonu X-100 (2 ml), ke které se přidá 140 μ l Giemsova barviva (připraveného uvedeným způsobem) a 25 μ l May-Grünwaldova barviva.

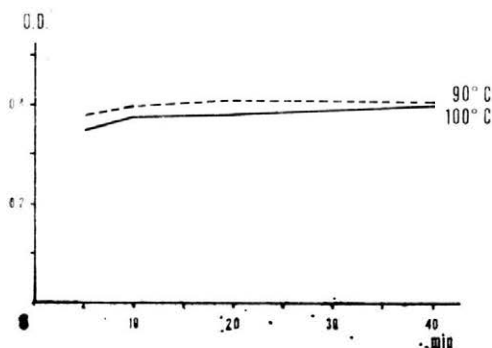
VÝSLEDKY

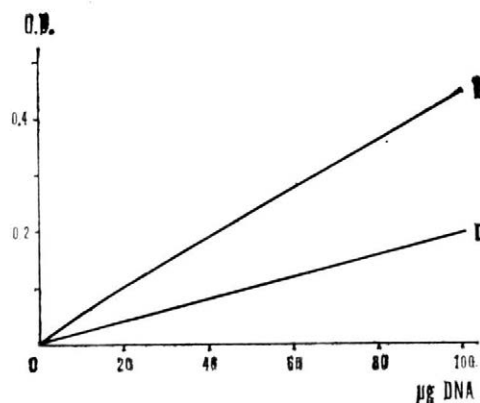
Vliv doby a teploty zahřívání difenylaminového činidla se 100 μ g DNA v přítomnosti nitrocelulóзовého membránového filtru na optickou denzitu znázorňuje obr. 1. Maximální extinkce při teplotě 90 °C bylo dosaženo po 20 minutách, zatímco při teplotě 100 °C se extinkce pomalu zvyšovala až do 40. minuty.

Z obr. 2 je patrné, že barevná reakce s difenylaminem je méně citlivá než barevná reakce s indolem. Barevnou reakcí s difenylaminem můžeme s dostatečnou přesností stanovit 400 tisíc buněk na mililitr mléka až při filtraci 10 ml mléka, zatímco při použití indol DNA filtr metody již při filtraci 2,5 až 5,0 ml mléka (Urbanová aj., 1985). Poněvadž je to dáno především měřením optické denzity v oblasti blízké začátku stupnice, můžeme přesnost stanovení zvýšit použitím 2 cm až 3 cm kyvety při měření nebo zvětšením objemu mléka filtrovaného přes membránový filtr.

Tab. I porovnává výsledky stanovení počtu somatických buněk v roz-

1. Účinek doby a teploty zahřívání na optickou denzitu (O. D.) 200 μ g DNA s difenylaminovým činidlem. Vzorky byly měřeny v kyvetě 1 cm při 595 nm na spektrofotometru Spektromom (MOM, Maďarsko) — The effect of warming time and temperature on the optical density (O. D.) of 200 μ g DNA with diphenylamine agent. The samples were measured in a 1 cm cell at 595 nm on the Spektromom spectrophotometer (MOM, Hungary)





2. Optická denzita (O. D.) různých množství DNA v barevných reakcích s indolem a difenylaminem (D = difenylamin DNA filtr metoda; I = indol DNA filtr metoda; ostatní detaily jsou v legendě k obr. 1). — The optical density (O. D.) of different DNA amounts in the colour reactions with indole and diphenylamine (D = diphenylamine DNA filter method; I = indole DNA filter method; the other details cf. Fig. 1)

pětí 50 000 až 2 000 000 na mililitr mléka přímou mikroskopií na filtrech a difenylamin DNA filtr metodou. Výsledky jsou vzájemně ve velmi dobré shodě — korelační koeficient mezi oběma způsoby stanovení činil 0,997; variační koeficient stanovení difenylamin DNA filtr metodou byl pouze 5,9 %.

Tab. II srovnává výsledky dvou operátorů při stanovení počtu buněk ve stejných vzorcích mléka přímou mikroskopií na filtrech a difenylamin DNA filtr metodou. Operátor II měl poněkud vyšší variabilitu při stanovení přímou mikroskopií na filtru, ale rozdíl ve výsledcích obou operátorů nebyl významný.

Pro převod obsahu DNA naměřeného ve vzorku mléka na počet buněk bylo použito vztahu $8 \mu\text{g} = 1$ milión somatických buněk, protože ta-

I. Stanovení počtu somatických buněk v mléce přímou mikroskopií na filtrech a difenylamin DNA filtr metodou — The determination of the counts of somatic cells in milk by direct microscopy on filters and by the diphenylamine DNA filter method

Vzorek číslo	PM		DNA difenylamin		
	počet buněk $\cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1} \pm \text{SD}$	variační koeficient %	filtrovaný objem mléka (ml)	počet buněk $\cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1} \pm \text{SD}$	variační koeficient %
1	55 $\pm$ 2	3,6	80	54 $\pm$ 2	3,7
2	146 $\pm$ 16	10,9	40	149 $\pm$ 6	4,0
3	429 $\pm$ 48	11,2	20	432 $\pm$ 16	3,7
4	512 $\pm$ 32	6,3	10	475 $\pm$ 35	7,4
5	787 $\pm$ 48	6,1	10	750 $\pm$ 60	8,0
6	866 $\pm$ 35	4,0	10	962 $\pm$ 11	1,1
7	1145 $\pm$ 114	10,0	10	1148 $\pm$ 95	8,3
8	1767 $\pm$ 154	8,7	10	1752 $\pm$ 136	7,8
Průměr		7,6			5,5

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

II. Výsledky stanovení počtu somatických buněk v mléce přímou mikroskopií na filtru a metodou difenylamin DNA filtr, získané dvěma operátory — The results obtained by two operators determining the counts of somatic cells in milk by direct microscopy on filter and by the diphenylamin DNA filter method

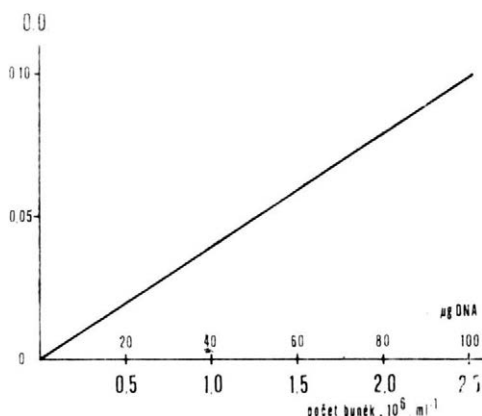
Vzorek číslo	Operátor I		Operátor II		Průměrný variační koeficient %
	PM filtry $\bar{x} \pm SD$	variační koeficient %	PM filtry $\bar{x} \pm SD$	variační koeficient %	
1	146 $\pm$ 16	10,9	149 $\pm$ 29	19,5	15,2
2	429 $\pm$ 48	11,2	392 $\pm$ 50	12,8	12,0
3	866 $\pm$ 35	4,0	805 $\pm$ 56	7,0	5,5
Průměr		8,7		13,1	
Vzorek číslo	DNA difenyl $\bar{x} \pm SD$		DNA difenyl $\bar{x} \pm SD$		průměrný variační koeficient %
	DNA difenyl $\bar{x} \pm SD$	variační koeficient %	DNA difenyl $\bar{x} \pm SD$	variační koeficient %	
1	144 $\pm$ 8	5,6	149 $\pm$ 6	4,0	4,8
2	477 $\pm$ 16	3,4	432 $\pm$ 16	3,7	3,6
3	971 $\pm$ 7	0,7	962 $\pm$ 11	1,1	0,9
Průměr		3,2		3,0	

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 difenylamin DNA filtr metodou (DNA difenyl), představují průměry tří stanovení počtu buněk. $10^3 \cdot \text{ml}^{-1} \pm SD$

to hodnota nejlépe odpovídá počtu buněk zjištěnému přímou mikroskopií na filtrech (tab. I a II).

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 ml mléka. Na obr. 3 je uveden příklad pro filtrovaný objem

3. Vztah mezi optickou densitou a počtem somatických buněk na ml pro filtrovaný objem mléka 10 ml při použití difenylamin DNA filtr metody (pro přepočet μg DNA na počet somatických buněk bylo použito vztahu $8 \mu\text{g}$ DNA = 1 milión buněk; ostatní detaily jsou v legendě k obr. 1) — The relation between the optical density and the counts of somatic cells per ml for the filtered milk volume of 10 ml when the diphenylamine DNA filter method is used (the relation $8 \mu\text{g}$ DNA = 1 million cells was used for the conversion of μg DNA to the counts of somatic cells; the other details cf. Fig. 1)



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

Doba skladování (dny)	Mléko	Filtry se zachycenými buňkami	
	skladování při teplotě -20 °C	skladování při teplotě 4 °C	skladování při teplotě -20 °C
3	690 ± 51	724 ± 28	706 ± 31
7	689 ± 20	675 ± 61	683 ± 57
10	691 ± 17	704 ± 66	708 ± 80

Počet somatických buněk v čerstvém mléce, stanovený přímou mikroskopií na filtru ($n = 7$), činil $670 \pm 62 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$, difenylamin DNA filtr metodou $702 \pm 32 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$. Hodnoty v tabulce jsou průměry sedmi stanovení počtu somatických buněk. $10^3 \cdot \text{ml}^{-1} \pm \text{SD}$

IV. Vliv skladování mléka stabilizovaného formaldehydem na stanovení počtu somatických buněk difenylamin DNA filtr metodou — The effect of the storage of formaldehyde-stabilized milk on the determination of the counts of somatic cells by the diphenylamine DNA filter method

Stabilizátor	Teplota skladování °C	Doba skladování	
		3 dny	8 dní
Formaldehyd 40%	4	1213 ± 59	1041 ± 99

K pokusům bylo použito mléko, ve kterém bylo přímou mikroskopií na filtru ($n = 4$) zjištěno $1144 \pm 94 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ somatických buněk. Hodnoty v tabulce jsou průměry čtyř stanovení počtu buněk. $10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ mléka $\pm \text{SD}$. Formaldehyd byl použit v množství 100 μl na 10 ml mléka

vzorku mléka 10 ml. Jestliže je např. nalezena u vzorku extinkce, která odpovídá 80 μg DNA, znamená to, že v každém ml mléka je 8 μg DNA, tedy 1 milion buněk. Na obr. 3 je tedy vyznačen 1 milion buněk na mililitr mléka na ose x místo 80 μg DNA.

Skladování mléka při teplotě -20 °C nebo membránových filtrů se zachycenými buňkami při teplotě 4 °C nebo -20 °C po dobu deseti dnů neovlivnilo stanovení počtu buněk DNA filtr metodou (tab. III). Membránové filtry se zachycenými buňkami mohou být nejméně tři dny skladovány i při pokojové teplotě, aniž by byl výsledek stanovení počtu buněk ovlivněn. Ve vzorku mléka, ve kterém bylo přímou mikroskopií na filtru ($n = 4$) stanoveno $1144 \pm 94 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ somatických buněk, bylo po třech dnech skladování filtrů se zachycenými buňkami při pokojové teplotě stanoveno difenylamin DNA filtr metodou $989 \pm 77 \cdot 10^3$ somatických buněk na mililitr. Mléko stabilizované 40% formaldehydem (100 μl formaldehydu na 50 ml mléka) mohlo být použito pro stanovení somatických buněk ještě po osmi dnech skladování při teplotě 4 °C (tab. IV).

Základní požadavky pro pravidelné stanovování počtu somatických buněk v mléce do značné míry splňuje difenylamin DNA filtr metoda, vyvinutá *Hutjensem* aj. (1970). Nevýhodou metody je extrakce DNA somatických buněk kyselinou trichlóroctovou (TCA) a 16hodinová inkubace (30 °C) extraktu s difenylaminovým činidlem. V naší práci bylo od předběžné extrakce DNA somatických buněk TCA upuštěno, poněvadž vede k destrukci desoxyribózy (naše nepublikované výsledky). Inkubace filtrů se zachycenými buňkami s difenylaminovým činidlem byla zkrácena na dobu 20 minut při teplotě 90 až 100 °C. Přesnost stanovení počtu buněk je při tomto způsobu zpracování vysoká. Průměrný variační koeficient stanovení počtu somatických buněk v mléce dojníc činil difenylamin DNA filtr metodou 3,0 až 5,9 %. Rozdíly ve stanovení provedeném dvěma operátory nebyly významné. Stanovení nevyžaduje speciální vybavení laboratoře. Pro DNA filtr metodu postačuje kolorimetr, např. Spekol, který je v současné době běžným vybavením i malých laboratoří Státního veterinárního ústavu a okresních veterinárních laboratoří. Použitím Spekolu odpadá nákladná údržba elektronického zařízení automatických počítačů.

Náklady na potřebné chemikálie jsou nízké. Určitým problémem jsou však dosud nepravidelné dodávky požadovaných membránových filtrů Synpor 1 a 2 z n. p. Labora. Výrobci filtrů, n. p. Barvy a laky, Praha, se totiž několik let nedaří zajistit dostatečný objem výroby filtrů, který by splnil požadavky jak zahraničních, tak domácích odběratelů.

Stanovení počtu somatických buněk v mléce DNA filtr metodou je možné velmi snadno standardizovat tím, že se připraví standardní roztoky DNA centrálně a jednotlivým laboratorím se zašlou zkumavky s odpařeným standardem pro kalibraci nebo se rozešlou membránové filtry se známým počtem zachycených somatických buněk. V pokusech, jejichž výsledky předkládáme, bylo pro převod naměřených μg DNA ve vzorku na počet buněk použito hodnoty $8\mu\text{g DNA} = 1$ milión buněk, což při použitém standardu DNA nejlépe odpovídalo počtu somatických buněk v mléce stanovenému přímou mikroskopií na membránovém filtru. Jiní autoři použili v závislosti na čistotě použitého standardu DNA a referenční metody počítání somatických buněk v mléce pro převod naměřených μg DNA vzorku pro 1 milión buněk hodnoty $7\mu\text{g DNA}$ (*De Langen*, 1967) a $9\mu\text{g DNA}$ (*Hutjens* aj., 1970).

DNA bakterií, které jsou ve vzorcích mléka, by neměly narušovat stanovení DNA somatických buněk, poněvadž bakterie z velké části procházejí membránovým filtrem. Navíc bakteriální buňka obsahuje pouze 0,002 až 0,06 pg DNA, zatímco somatické buňky savců obsahují 6 až 8 pg DNA (*Brawerman a Shapiro*, 1962; *De Langen*, 1967).

Počet buněk difenylamin DNA filtr metodou je možné stanovit i ze vzorků mléka uložených ve zmrazeném stavu, popřípadě je možné uložit filtry se zachycenými buňkami. Filtry se zachycenými somatickými buňkami se mohou při teplotě 4 °C skladovat alespoň deset dní a při teplotě 25 °C tři dny, aniž by byl výsledek stanovení ovlivněn. Ke stanovení počtu somatických buněk je možné použít i mléko stabilizované formaldehydem, pokud je uloženo při teplotě 4 °C. *Hutjens* aj. (1970) doporučují skladovat mléko stabilizované formaldehydem při pokojové

teplotě, ale podle našich zkušeností se v takto skladovaném mléce zjišťuje arteficiálně vyšší počet buněk (naše nepublikované výsledky).

I při použití pouze jednoho filtračního zařízení může jeden pracovník za tři dny analyzovat 200 vzorků, včetně přípravy reagentů apod. Hlavní uplatnění této metody je proto v malých laboratořích SVÚ a OVL a ve velkých laboratořích, ve kterých by počet vyšetřovaných vzorků nepřesáhl uvedeně množství. Ve velkých laboratořích SVÚ by DNA filtr metoda mohla sloužit pro přípravu pilotních vzorků.

Literatura

- BRAWERMAN, G. — SHAPIRO, H. S.: In: Comparative Biochemistry. New York, Academic Press, Vol. IV, 1962, s. 124.
- DeLANGEN, H.: Determination of DNA in milk. Aust. J. Dairy Technol., 22, 1967, s. 36-40.
- DISCHE, Z.: Color reactions of nucleic acid components. In: The Nucleic Acids. E. CHARGAFF, J. N. DAVIDSON (Eds.). New York, Academic Press Inc., Vol. 1., 1955, s. 285-305.
- DUITSCHAEVER, C. L. — LEGGATT, A. G.: Cells in bovine milk: Differential staining in suspension: collecting, counting and examining on millipore membrane. Stain Technol., 42, 1967, s. 183-194.
- 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.
- LEE, C. S. — WOODING, F. B. P. — KEMP, P.: Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. J. Dairy Res., 47, 1980, s. 39-50.
- PAAPE, M. J. — WERGIN, W. P. — GUIDRY, A. J. — SCHULZE, W. D.: Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. In: The Ruminant Immune System. J. E. BUTLER (Ed.), Plenum Publ. Corp., 1981, s. 555-578.
- SCHALM, O. W. — CARROLL, E. J. — JAIN, N. C.: Bovine mastitis. Philadelphia, Lea and Febiger 1971.
- 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.
- URBANOVÁ, E. — ŠEDINOVÁ, V. — ŠKARDA, J. — ŠKARDOVÁ, O. — JUKL, A.: Využití membránových filtrů Synpor pro separaci a stanovení počtu somatických buněk mléka dojníc indol DNA filtr metodou. Veter. Med. (Praha), 30, 1985, č. 7, s. 409-418.

Došlo dne 28. 6. 1984

ШЕДИНОВА, В. — УРБАНОВА, Э. — ШКАРДА, Й. — ЮКЛ, А. (Институт физиологии и генетики сельскохозяйственных животных АН ЧССР, Прага): Определение количества соматических клеток в молоке по скоростному методу дифениламин ДНА-фильтр. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8): 467-475.

Быстрая реакция дифениламинного реагента с ДНА была использована для определения количества соматических клеток в молоке коров с помощью метода ДНА-фильтр. Метод основан на фильтрации подогретой (65–70 °C) смеси молока с Тритоном Икс-100 через нитроцеллюлозный мембранный фильтр Синпор с размерами пор 2–5 мкм и на последующем определении ДНА задержанных соматических клеток с помощью цветной реакции дифениламина. К мембранным фильтрам с этими клетками добавляют 2 мл дистилл. воды и 4 мл дифениламинного реагента. Смесь выдерживают 20 мин. в водяной бане при 90–100 °C, охлаждают, центрифугируют (3500xg, 15 мин.) и измеряют оптическую непрозрачность при 595 мкм. Для перевода содержания ДНА на количество клеток пользовались отношением 8 мкг = 1 млн. клеток. Средний коэффициент вариации = 5,9 %, а коэффициент корреляции между методом ДНА-фильтр и прямой микроскопией клеток на мембранных фильтрах $r = 0,997$. Количество клеток по первому методу можно определять и из молочной пробы, хранимой в замороженном состоянии, или же из фильтров с задержанными клетками, хранимыми при 4 °C (10 дней) или при 25 °C (3 дня). Для определений может служить и стабилизированное формальдегидом молоко, если хранится при 4 °C.

молоко; соматические клетки; определение; ДНА-фильтр метод; мембранные фильтры

SEDINOVÁ, V. — URBANOVÁ, E. — ŠKARDA, J. — JUKL, A. (Institute of Animal Physiology and Genetics, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha): *The Determination of the Counts of Somatic Cells in Milk by the Rapid Diphenylamine DNA Filter Method*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 467-475.

The rapid reaction of the diphenylamine agent with DNA was used for the determination of the counts of somatic cells in cow's milk, using the DNA filter method. The method is based on the filtration of a warmed (65–70 °C) mixture of milk with Triton X-100 through the Synpor nitrocellulose membrane filter, pore size 2 to 5 μm , and subsequent DNA determination of the collected somatic cells by the colour reaction of diphenylamine. A 2ml quantity of distilled water and 4 ml of diphenylamine reagent were added to the membrane filters with somatic cells. The mixture is warmed in water bath at 90 to 100 °C for 20 min., then it is cooled, centrifuged (3500 $\times$ g, 15 min.), and the optical density is measured at 595 nm. The relation 8 μg = 1 million cells was used for the conversion of DNA content to the counts of cells. The average variation coefficient of the determination was 5.9 % and the coefficient of correlation between the diphenylamine DNA filter method and the direct microscopy of the somatic cells on membrane filters was $r = 0.997$. Using the diphenylamine DNA filter method, the counts of somatic cells can also be determined from milk samples stored in frozen condition or from the filters with collected cells kept at the temperature of 4 °C (10 days) or 25 °C (3 days). Milk stabilized with formaldehyde can also be used for the determination if stored at 4 °C.

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

SEDINOVÁ, V. — URBANOVÁ, E. — ŠKARDA, J. — JUKL, A. (Institut für Physiologie und Genetik landwirtschaftlicher Nutztier, Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften, Praha): *Bestimmung der Zahl somatischer Zellen in der Milch mittels schneller Diphenylamin-DNA-Filter-Methode*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 467-475.

Die schnelle Reaktion des Diphenylaminreagens mit DNA wurde zur Bestimmung der Zahl somatischer Zellen in der Kuhmilch mittels der DNA-Filter-Methode angewandt. Diese Methode beruht auf einer Filtration der erwärmten (65–70 °C) Mischung von Milch mit Triton X-100 durch das Nitrozellulose-Membranfilter Synpor mit einer Porenweite von 2 bis 5 μm und auf der darauf folgenden Bestimmung der durch DNA erfaßten somatischen Zellen aufgrund der Farbreaktion des Diphenylamins. Zu den Membranfiltern mit den aufgefangenen somatischen Zellen werden 2 ml destilliertes Wasser und 4 ml Diphenylaminreagens beigelegt. Diese Mischung wird 20 Minuten lang in einem Wasserbad von 90 bis 100 °C erwärmt, dann abgekühlt, zentrifugiert (3500 $\times$ g, 15 Min.) und die optische Densität bei 595 nm gemessen. Für die Umgestaltung des DNA-Gehalts auf die Zellenzahl wurde die Beziehung 8 μg DNA = 1 Million Zellen angewandt. Der mittlere Variationskoeffizient der Bestimmung betrug 5,9 % und der Korrelationskoeffizient zwischen der Diphenylamin-DNA-Filter-Methode und der direkten Mikroskopie der somatischen Zellen auf den Membranfiltern war $r = 0,997$. Die Zellenzahl kann mit Hilfe der Diphenyl-DNA-Filter-Methode auch aus Milchproben, die tiefgekühlt aufbewahrt werden, oder aus Filtern mit den aufgefangenen Zellen, die bei Temperaturen von 4 °C (10 Tage lang) oder 25 °C (3 Tage lang) gelagert sind, bestimmt werden. Zur Bestimmung kann ebenfalls durch Formaldehyd stabilisierte Milch angewendet werden, falls sie bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt wird.

Milch; somatische Zellen; Bestimmung; DNA-Filter-Methode; Membranfilter

Adresa autorů:

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

B. Skalka

SKALKKA, B. (Vysoká škola veterinární, Brno): *Aktualizované schéma pro diagnostiku stafylokoků*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 477-484.

Bylo vypracováno simplifikované schéma subdivize koaguláza-pozitivních stafylokoků a zjednodušené schéma pro diagnostiku koaguláza-negativních druhů. Na podkladě produkce stafylokinázy, koagulace humánní a bovinní plazmy, tvorby acetoinu z glukózy a růstu na agaru s krystalovou violetí je možné určit jak *S. aureus* a jeho biovary A, B, C1, C2, D, tak i *S. intermedius*. Koaguláza-negativní druhy lze diagnostikovat podle jejich citlivosti k novobiocinu, redukce nitrátů, fermentace maltózy, sacharózy, salicinu, xylózy, trehalózy, manitu, mannózy a hemolytické aktivity. Návrh diagnostických schémat byl úspěšně ověřen na sbírkových kmenech a na 1305 kmenech stafylokoků izolovaných především z mléčné žlázy skotu, ze psů, z člověka a z kura domácího. U kmenů *S. aureus* byl potvrzen úzký vztah mezi jejich biotypizační charakteristikou a druhem hostitele. Podobný vztah byl určen pro *S. intermedius*. Z koaguláza-negativních druhů byly nejčastěji diagnostikovány *S. epidermidis*, *S. hominis* a *S. haemolyticus*. Obě předložená schémata představují spolehlivou, rychlou a technicky nenáročnou metodu diagnostiky mikroorganismů rodu *Staphylococcus*.

rod *Staphylococcus*; zjednodušená biotypizace *S. aureus*; diagnostika *S. intermedius*; diagnostika koaguláza-negativních druhů

Počet druhů v rodu *Staphylococcus* se v současnosti značně rozšířil. Místo tří druhů [Baird — Parker, 1974], ze kterých byl pouze jeden koaguláza-pozitivní, existují dnes dva koaguláza-pozitivní druhy, *S. aureus* a *S. intermedius* [Hájek, 1976], dále pak řada druhů koaguláza-negativních: *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. xylo-sus* [Schleifer a Kloos, 1975], *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. simulans* [Kloos a Schleifer, 1975], *S. sciuri* se dvěma poddruhy, subsp. *sciuri* a subsp. *lentus* [Kloos aj., 1976], *S. hyicus* [Devriese, 1977] a jeho dva poddruhy, subsp. *hyicus* a subsp. *chromogenes* [Devriese aj., 1978], *S. saccharolyticus* [Kilper — Bälz a Schleifer, 1981], *S. caseolyticus* [Schleifer aj., 1982], *S. carnosus* [Schleifer a Fischer, 1982], *S. gallinarum*, *S. caprae* [Devriese aj., 1983].*)

Pro subdivizi *S. aureus* je doporučena biotypizace [Hájek a Maršálek, 1976], kterou jsme navrhli k rutinnímu používání [Skalka a Smola, 1981, 1982]. Vzhledem k úzké relaci, kterou má biotyp (resp. biovar) k typickému hostiteli, může být označen jako eko-var nebo forma specialis [Hájek a Schindler, 1981].

*) Když byla tato studie připravována pro tisk, byly určeny další koaguláza-negativní druhy: *S. arlettae*, *S. equorum* a *S. kloosii* [Schleifer aj., 1984].

Snaha zpřístupnit metodu širokému použití vedla k tomu, že byly vypracovány návrhy, jak zjednodušit jednak diagnostiku koaguláza-negativních stafylokoků (Akátov aj., 1981), jednak biotypizaci *S. aureus* (Devriese, 1984).

Opodstatněnost uvedeného členění v rámci rodu *Staphylococcus* vyplývá nejen z recentních taxonomických studií (Skerman aj., 1980; Hill, 1981), ale i z prací sledujících ekologii stafylokoků (Devriese a Keyser, 1980; Akátov aj., 1983; Park a Cho, 1983).

MATERIÁL A METODY

MÉDIA

Jako základ pro živné půdy jsme používali média z IMUNY, n. p., a to živný bujón č. 1 a základ pro krevní agar č. 4. Uvedené základy byly pro další použití suplementovány adekvátními ingrediencemi. Výchozí pH médií bylo upravováno na 7,6.

BIOTYPIZAČNÍ A DIAGNOSTICKÉ TESTY

Testace fermentační aktivity odpovídala recentně doporučeným laboratorním technikám (Devriese aj., 1983; Devriese, 1984).

Koagulační testy se třemi druhy plazem byly dělány podle Hájka a Maršálka (1976).

Růst stafylokoků na agaru s krystalovou violetí (CVtest) a jeho interpretace byly realizovány podle předchozího popisu (Skalka a Smola, 1981).

Senzitivitu (S) a rezistenci (R) k novobiocinu jsme testovali pomocí disků z filtračního papíru s obsahem antibiotika 5 μ g na disk, na agarovém médiu.

Pro všechny kultivační pokusy byla používána teplota 37 °C.

BAKTERIÁLNÍ KMENY

Byla použita vlastní kolekce kmenů *S. aureus*, zahrnující reprezentanty biovar A, B, C1, C2 a D, stejně jako kmeny *S. intermedius*, zařazené dříve jako biovar E a F. Dále byly použity kmeny *S. saprophyticus* CCM 883, *S. cohnii* CCM 2736, *S. xylosum* CCM 2738, *S. sciuri* CCM 3473, *S. capitis* CCM 2734, *S. hyicus* CCM 2368, *S. simulans* CCM 2705, *S. epidermidis* CCM 2124, *S. hominis* CCM 3474, *S. warneri* CCM 2730, *S. haemolyticus* CCM 2737. Uvedené kmeny byly použity jako kontroly.

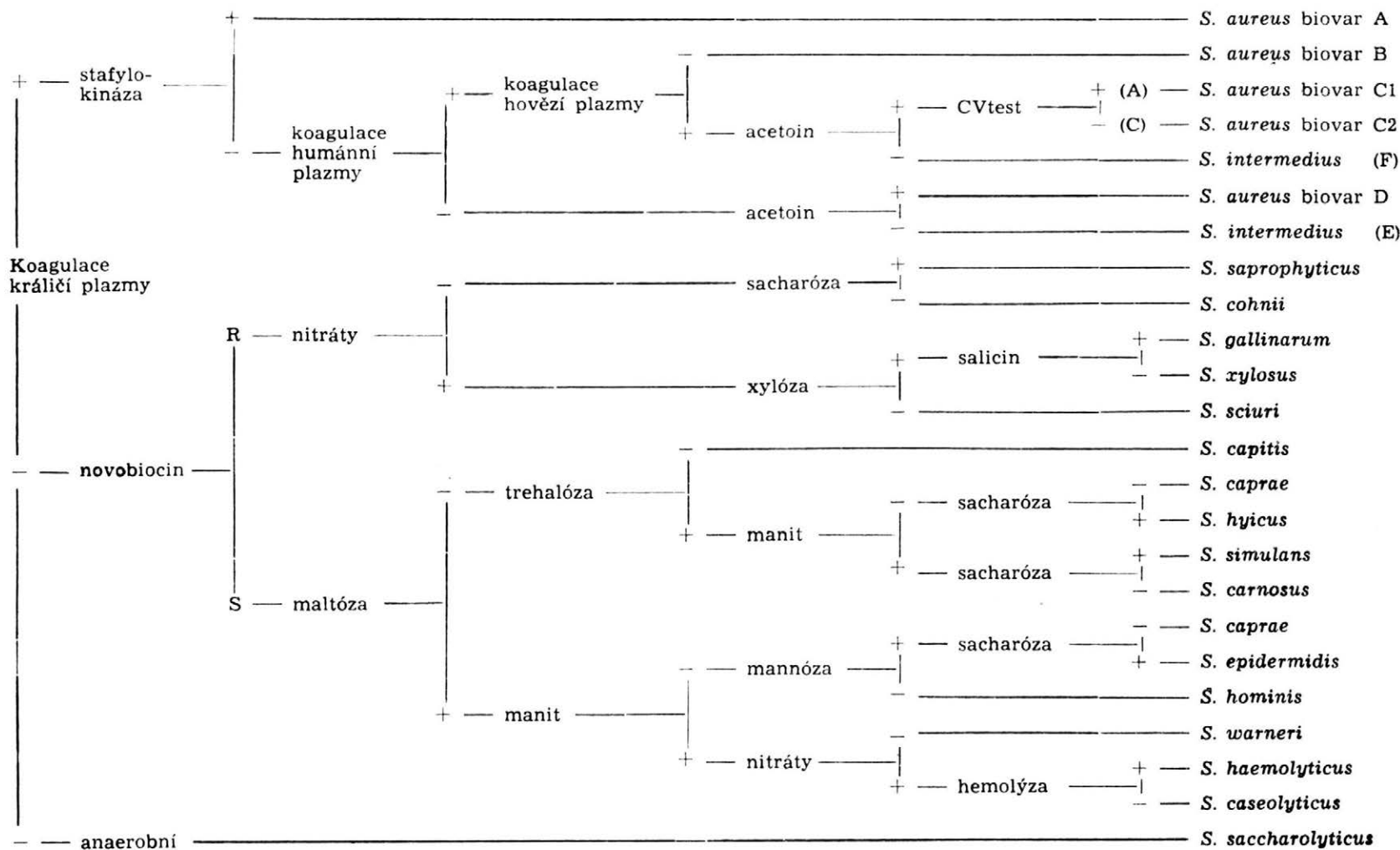
Pro vlastní studii jsme použili celkem 1305 stafylokokových kmenů, které byly izolovány především z mléčné žlázy skotu, ze psů, z kura domácího a z člověka.

VÝSLEDKY

Kmeny příslušející do rodu *Staphylococcus* byly rozděleny na podkladě aktivity v králičí plazmě na koaguláza-pozitivní (Ko^+) a koaguláza-negativní (Ko^-). Pro Ko^+ kmeny byly použity testy produkce stafylokinázy, koagulace humánní a bovinní plazmy, produkce acetoinu z glukózy a růst na agaru s krystalovou violetí. Podle výsledků uvedených testů bylo možné diferencovat *S. aureus* a jeho biovary A, B, C1, C2, D od *S. intermedius*, resp. dřívějších biovar E a F. Postup biotypizace je uveden v tab. I.

Základem diferenciací Ko^- kmenů byla jejich citlivost k novobiocinu. Další použité testy byly redukce nitrátů, fermentace maltózy, sacharózy, salicinu, xylózy, trehalózy, manitu, mannózy a hemolytická

I. Schéma biotypizace *S. aureus* a diagnostiky koaguláza-negativních stafylokoků — Scheme of the *S. aureus* biotyping and diagnostics of coagulase-negative staphylococci



aktivita na krevním agaru s pranými ovčími erytrocyty. Schéma postupu diagnostiky Ko^- kmenů je uvedeno v tab. I. Oba popsané diagnostické postupy byly ověřeny se známými kontrolními Ko^+ a Ko^- stafylokoky.

Z celkového počtu vyšetřených kmenů bylo 864 kmenů izolováno z mléčné žlázy skotu, 178 ze psů, 181 z lidí, 36 z kura domácího a 46 kmenů bylo různé provenience. Z 1091 Ko^+ kmenů náleželo 879 k druhu *S. aureus* a 212 k *S. intermedius*. 214 kmenů bylo Ko^- .

Z bovinních Ko^+ kmenů představoval *S. aureus* 91,5 % a 8,5 % se řadilo do druhu *S. intermedius*. Z *S. aureus* kmenů patřilo k biovar C1 78 % a k C2 20,2 %. Ze 152 Ko^+ stafylokoků izolovaných ze psů bylo 85 % *S. intermedius* a 15 % *S. aureus*. Z humánních Ko^+ kmenů bylo 95 % *S. aureus* a z toho 91 % náleželo k biovar A. Stafylokokové kmeny izolované z kura domácího se vesměs řadily do biovar B.

II. Druhové zařazení a biotypizace použitých kmenů stafylokoků — Species identification and biotyping of the staphylococci strains

Druh	Počet kmenů podle původu				
	skot	pes	člověk	kur domácí	různý
<i>S. aureus</i> biovar A	9	12	80	2	8
biovar B	4	0	0	27	3
biovar C1	564	7	3	0	0
biovar C2	146	4	5	0	0
biovar D	0	0	0	0	5
<i>S. intermedius</i>	67	129	5	2	9
<i>S. saprophyticus</i>	5	2	6	0	2
<i>S. cohnii</i>	1	0	2	0	0
<i>S. gallinarum</i>	0	0	0	1	1
<i>S. xylosus</i>	10	4	6	1	2
<i>S. sciuri</i>	0	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	2	1	7	0	2
<i>S. caprae</i>	2	0	0	0	0
<i>S. hyicus</i>	3	0	0	0	3
<i>S. simulans</i>	5	3	9	0	0
<i>S. carnosus</i>	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	16	7	21	1	1
<i>S. hominis</i>	12	5	18	0	3
<i>S. warneri</i>	0	0	2	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	12	3	14	2	6
<i>S. caseolyticus</i>	0	0	0	0	0
neklasifikovatelné	6	1	3	0	1

Z 214 *Ko⁻* stafylokoků představoval druh *S. epidermidis* 21,5 %, *S. hominis* 17,7 %, *S. haemolyticus* 17,3 %, *S. xylosus* 10,7 %, *S. simulans* 7,9 %, *S. saprophyticus* 7 %, *S. capitis* 5,6 %. Ostatní druhy byly zastoupeny ojediněle. Nepodařilo se nám určit druhovou příslušnost u 5,1 % *Ko⁻* kmenů. Popsané výsledky jsou souhrnně podány v tab. II.

DISKUSE

Na podkladě dřívějších vlastních výsledků subdivize *S. aureus* (Skalka a Smola, 1981, 1982) jsme vypracovali schéma zjednodušené biotypizace tohoto bakteriálního druhu, které rozšiřujeme o návrh simplifikovaného diagnostického postupu pro koaguláza-negativní stafylokoky. Biotypizace *S. aureus* není oficiálně přijatou metodou subdivize tohoto druhu, je však doporučována pro objasnění relací izolovaného kmene a hostitelského organismu (Hájek a Schindler, 1981; Hill, 1981). *S. intermedius* a nové koaguláza-negativní druhy popsané do roku 1979 jsou uvedeny v ověřeném seznamu bakteriálních jmen (Skerman aj., 1980), a proto se zdá být vysoce pravděpodobné, že budou akceptovány v očekávaném devátém vydání „Bergey's manual“. Tím se jejich používání stane do určité míry závazné.

Předložený návrh diagnostického schématu je koncipován na bázi dichotomie. Souhlasíme s názorem (Hill, 1981), že zejména pro kompletní taxonomické studie není tato metoda ideální. Domníváme se však, že pro rutinní diagnostiku splňuje požadavky relativní přesnosti. Nad to nevylučuje použití komplexu testů, které se uvádějí v charakteristice každého druhu.

Naše snaha o diagnostickou simplifikaci v rámci rodu *Staphylococcus* není ojedinělá. Existují analogické studie jak pro biotypizaci (Devriese, 1984), od kterých se náš návrh takřka neodlišuje, tak na simplifikaci diagnostiky koaguláza-negativních stafylokoků (Akato aj., 1981), ve kterých jsou použity takřka stejné testy jako v našem návrhu; nejsou tam však pochopitelně zahrnuty druhy popsané po roce 1980.

Předložená studie měla ekologický charakter pouze u koaguláza-pozitivních stafylokoků. Dosažené výsledky nejsou odlišné ani od našich předchozích zjištění (Skalka a Smola, 1982), ani od údajů jiných autorů (Hájek a Maršálek, 1976). Diagnostika koaguláza-negativních kmenů se zaměřila především na ověření vypracovaného schématu diagnostiky. Z hlediska zjištěného procentuálního zastoupení druhů ve sledovaném souboru bylo dosaženo podobných výsledků, jaké uvádějí ve své studii Park a Cho (1983). Odlišujeme se však svými výsledky od údajů jiného kolektivu autorů (Akato aj., 1983), což je možné vysvětlit různými zdroji, ze kterých byly kmeny izolovány. Na rozdíl od obou citovaných prací jsme se setkali s menším počtem neklasifikovatelných kmenů.

Domníváme se, že jsme předložili dostupnou metodu subdivize rodu *Staphylococcus* a potvrdili její použitelnost ověřením na dostatečném počtu stafylokokových kmenů.

Literatura

- AKATOV, A. K. — KHATENEVER, M. L. — DEVRIESE, L. A.: Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical sources. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt., Suppl., 10, 1981, s. 153-161.
- AKATOV, A. K. — SAMSONOVA, T. M. — PARČINSKAJA, I. A.: Vidovaja charakteristika koagulazootcatělných stafylokokov životnogo proischožděniya. Ž. Mikrobiol. Epidemiol. Immunol., 1983, č. 9, s. 37-40.
- BAIRD-PARKER, A. C.: Genus II. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, s. 483-489. In: BUCHANAN, R. E. — GIBBONS, N. E.: Bergey's manual of determinative bacteriology. Eighth edition. Baltimore. The Williams et Wilkins Company 1974. 1268 s.
- DEVRIESE, L. A.: Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. Amer. J. veter. Res., 38, 1977, s. 787-792.
- DEVRIESE, L. A.: A simplified system for biotyping of *Staphylococcus aureus*. J. appl. Bact., 56, 1984, s. 215.
- DEVRIESE, L. A. — HÁJEK, V. — OEDING, P. — MEYER, S. A. — SCHLEIFER, K. H.: *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. Int. J. syst. Bact., 28, 1978, s. 482-490.
- DEVRIESE, L. A. — KEYSER, H.: Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. J. Dairy Res., 47, 1980, s. 155-158.
- DEVRIESE, L. A. — POUTREL, B. — KILPPER-BÄLZ, R. — SCHLEIFER, K. H.: *Staphylococcus gallinarum* and *Staphylococcus caprae*, two new species from animals. Int. J. syst. Bact., 33, 1983, s. 480-486.
- HÁJEK, V.: *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. Int. J. syst. Bact., 26, 1976, s. 401-408.
- HÁJEK, V. — MARŠÁLEK, E.: Evaluation of classificatory criteria for staphylococci. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt., Suppl. 5, 1976, s. 11-21.
- HÁJEK, V. — SCHINDLER, J.: Cluster analysis of coagulase-positive staphylococci. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt., Suppl. 10, 1981, s. 27-35.
- HILL, L. R.: Taxonomy of the staphylococci, s. 33-62. In: MACDONALD, A. — SMITH, G.: The staphylococci. Aberdeen University Press 1981. 288 s.
- KILPPER-BÄLZ, R. — SCHLEIFER, K. H.: Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* Faubert and Douglas to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus* (Faubert and Douglas) comb. nov. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt., C 2, 1981, s. 324-331.
- KLOOS, W. E. — SCHLEIFER, K. H.: Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. Int. J. syst. Bact., 25, 1975, s. 62-79.
- KLOOS, W. E. — SCHLEIFER, K. H. — SMITH, R. F.: Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. Int. J. syst. Bact., 26, 1976, s. 22-37.
- PARK, C. K. — CHO, Y. J.: Studies on staphylococci isolated from bovine udder infections. II. Distribution and biochemical properties of coagulase-negative staphylococci. Korean J. veter. Res., 23, 1983, s. 165-182.
- SCHLEIFER, K. H. — FISCHER, U.: Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. Int. J. syst. Bact., 32, 1982, s. 153-156.
- SCHLEIFER, K. H. — KLOOS, W. E.: Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. Int. J. syst. Bact., 25, 1975, s. 50-61.
- SCHLEIFER, K. H. — KILPPER-BÄLZ, R. — DEVRIESE, L. A.: *Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. nov.: Three new coagulase negative, novobiocin-resistant species from animals. Syst. appl. Bact., 5, 1984, s. 501-509.
- SCHLEIFER, K. H. — KILPPER-BÄLZ, R. — FISCHER, U. — FALLER, A. — ENDL, J.: Identification of "*Micrococcus candidus*" ATCC 14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of "*Micrococcus caseolyticus*" ATCC 13548 and *Micrococcus varians* ATCC 29750 as members of a new species *Staphylococcus caseolyticus*. Int. J. syst. Bact., 32, 1982, s. 15-20.
- SKALKA, B. — SMOLA, J.: Praktický význam biotypizace *Staphylococcus aureus*. Veterinářství, 31, 1981, s. 303-305.

SKALKA, B. — SMOLA, J.: Zkušnosti s biotypizací *Staphylococcus aureus*. Veterinářství, 32, 1982, s. 179-180.

SKERMAN, W. B. D. — McGOWAN, V. — SNEATH, P. H. A.: Approved lists of bacterial names. Int. J. syst. Bact., 30, 1980, s. 225-240.

Došlo dne 24. 8. 1984

СКАЛКА, Б. (Ветеринарный институт Брно): Актуализированная схема для диагностики стафилококков. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 477-484.

Была разработана симплифицированная схема субдिवизии коагулязо-положительных стафилококков и упрощенная схема для диагностики коагулязо-отрицательных видов. На основе продукции стафилокиназы, коагуляции плазмы человека и быка, образования ацетона из глюкозы и роста на агаре с кристаллическим фиолетовым можно определить как *S. aureus* и его биовары A, B, C1, C2, D, так и *S. intermedius*. Коагулязо-отрицательные виды можно определять по их чувствительности к новобиоцину, редукции нитратов, ферментации мальтозы, сахарозы, салицина, ксилозы, трегалозы, манита, маннозы и гемолитической активности. Проект диагностических схем успешно был проверен на коллекционированных штаммах и на 1305 штаммах стафилококков, прежде всего изолированных из молочной железы крупного рогатого скота, собак, человека и из домашних кур. У штаммов *S. aureus* было подтверждено тесное отношение между их биотипизационной характеристикой и видом хозяина. Аналогичное отношение было установлено для *S. intermedius*. Из коагулязо-отрицательных видов чаще всего были обнаружены *S. epidermidis*, *S. hominis* и *S. haemolyticus*. Обе предложенные схемы представляют надежный, быстрый и технически нетребовательный метод диагностики микроорганизмов рода *Staphylococcus*.

род *Staphylococcus*; упрощенная биотипизация *S. aureus*; диагностика *S. intermedius*; диагностика коагулязо-отрицательных видов

SKALKA, B. (University of Veterinary Medicine, Brno): An Up-dated Scheme for the Diagnostics of *Staphylococci*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 477-484.

A simplified scheme for the subdivision of coagulase-positive staphylococci and another simplified scheme for the diagnostics of coagulase-negative species were worked out. On the basis of the production of staphylokinase, coagulation of human and bovine plasma, acetoin production from glucose, and growth on agar with crystal violet, it is possible to identify *S. aureus* with its biovars A, B, C1, C2, D, as well as *S. intermedius*. The coagulase-negative species can be diagnosed according to their sensitivity to novobiocin, nitrate reduction, fermentation of maltose, sucrose, salicin, xylose, trehalose, mannitol and mannose, and haemolytic activity. The proposed diagnostic schemes were verified with success on the collection strains and on the 1305 staphylococci strains isolated largely from the bovine mammary gland, from dogs, man and domestic fowl. In *S. aureus* strains a close correlation was demonstrated between their biotype characteristics and the host species. A similar correlation was determined for *S. intermedius*. As to the coagulase-negative species, *S. epidermidis*, *S. hominis* and *S. haemolyticus* were diagnosed most frequently. Both schemes represent a reliable, prompt and technically simple method of the diagnostics of the *Staphylococcus* microorganisms.

Staphylococcus genus; simplified biotypification of *S. aureus*; *S. intermedius* diagnostics; diagnostics of coagulase-negative species

SKALKA, B. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): Aktualisiertes Schema der Diagnostik von *Staphylokokken*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 477-484.

Es wurden ein vereinfachtes Schema der Subdivision der Koagulase-positiven *Staphylokokken* und ein vereinfachtes Schema für die Diagnostik der Koagulase-negativen Arten ausgearbeitet. Aufgrund der Produktion von Staphylokokkinase, der Koagulation der humanen und Rinderplasma, der Bildung von Azetoin aus der Glukose und des Wachstums auf Agar mit Kristallviolett können sowohl *S. aureus* und seine Biovare A, B, C1, C2, D, als auch *S. intermedius* bestimmt werden. Die

Koagulase-negativen Arten können nach ihrer Empfindlichkeit gegen Novobiozin, ihrer Reduktion von Nitraten, ihrer Maltose-, Saccharose-, Salizin-, Xylose-, Trehalose-, Manit-, Mannosefermentation und nach ihrer hämolytischen Aktivität diagnostiziert werden. Der Entwurf von diagnostischen Schemata wurde erfolgreich an den einzelnen Sammlungsstämmen und an 1305 Stämmen der aus der Rindermilchdrüse, aus Hunden, Menschen und Geflügel isolierten Staphylokokken überprüft. Beim Stamm *S. aureus* wurde eine enge Beziehung zwischen ihrer Biotypisierungsscharakteristik und der Wirtsart nachgewiesen. Eine ähnliche Beziehung konnte für den Stamm *S. intermedius* beobachtet werden. Von den Koagulase-negativen Arten wurden am häufigsten die Arten *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* diagnostiziert. Die beiden vorgelegten Schemata stellen eine zuverlässige, schnelle und technisch wenig anspruchsvolle Methode zur Diagnostizierung der Mikroorganismen der Gattung *Staphylokokkus* dar.

Gattung *Staphylococcus*; vereinfachte Biotypisierung *S. aureus*; Diagnostik von *S. intermedius*; Diagnostik der Koagulase-negativen Arten

Adresa autora:

Doc. MVDr. Boris Skalka, CSc., Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

HLADINY KATECHOLOVÝCH AMÍNŮ V HYPOTALAME, HYPOFÝZE A V NADOBĚČKÁCH OVÍEC PO CELOTELOVEJ EXPOZICI GAMA-ŽIARENIA

B. Pástorová, J. Arendarčík, M. Molnárová

PÁSTOROVÁ, B. — ARENDARČÍK, J. — MOLNÁROVÁ, M. (Vysoká škola veterinárska, Košice): *Hladiny katecholových amínov v hypotalame, hypofýze a v nadobličkách oviec po celotelovej expozícii gama-žiarenia*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 485-492.

Študovali sme zmeny hladín katecholových amínov a L-DOPA v riadiacom systéme reprodukčného cyklu (hypotalamus, hypofýza) a v nadobličkách oviec po celotelovom ožiarení ^{60}Co celkovou dávkou 6,7 Gy po dobu 7 dní. Hodinový príkon zdroja žiarenia bol 0,039 Gy. Katecholové amíny (noradrenalín, dopamín a adrenalin) a L-DOPA sme po izolovaní z tkanív stanovili metódou spektrálnej fluorimetrie. Po celotelovej expozícii gama žiarenia poklesla hladina noradrenalínu v hypotalame oviec v porovnaní s kontrolnou skupinou, najvýraznejšie v rostrálnej (o 74,2 %) a v kaudálnej časti (o 40 %). Analogický pokles ako u noradrenalínu sme pozorovali aj v zastúpení dopamínu, ktorého koncentrácia klesla v rostrálnom hypotalame o 72 %, v mediálnom o 94 % a v kaudálnom hypotalame o 60 %. Adrenalin vykazuje v hypotalame pokles, ktorý je najvýraznejší v kaudálnej oblasti (o 62 %). V súvislosti s tým sa mení aj hladina prekursora pre syntézu katecholových amínov a L-DOPA, ktorý v študovaných oblastiach hypotalamu oviec dosahuje signifikantne nižšie hladiny, než sme stanovili u kontrolnej skupiny oviec. V hypofýze po ožiarení nedošlo k signifikantným zmenám hladín noradrenalínu a adrenalinu, ale dopamín a L-DOPA výrazne poklesli ($P < 0,01$). Expozícia gama žiarenia spôsobuje aj pokles koncentrácie katecholových amínov a L-DOPA v nadobličkách oviec, najvýraznejšie u noradrenalínu (o 61 %). Na základe dosiahnutých výsledkov usudzujeme, že celotelové ožiarenie oviec dávkou 6,7 Gy spôsobuje výrazný pokles obsahu katecholových amínov v hypotalame, hypofýze a v nadobličkách, čo pravdepodobne súvisí s porušením syntézy a degradácie katecholamínov a s celkovým poškodením organizmu.

katecholamíny; noradrenalín; adrenalin; dopamín; L-DOPA; spektrofotometrická metóda

Jedným zo závažných problémov, ktorému sa zo strany výskumu venuje pozornosť, je vplyv ionizujúceho žiarenia na hypotalamo-hypofýzárny systém ako riadiaci mechanizmus pohlavných funkcií zvierat (Hristič a Pantič, 1975; Arendarčík a i., 1980). V závislosti od druhu žiarenia, jeho dĺžky a celkovej dávky dochádza v ožiarených orgánoch alebo tkanive ku kvantitatívnym a kvalitatívnym zmenám, ktoré vedú aj k zmene funkcie príslušných štruktúr, ako sme to dokumentovali aj v našich predchádzajúcich prácach (Arendarčík a i., 1980; Staníková a i., 1983). Vzhľadom na to, že sa katecholamíny zúčastňujú na regulácii pohlavných funkcií, zamerali sme sa na štúdium zmien

ich zastúpenia v riadiacom systéme reprodukčného cyklu (hypotalamus, hypofýza) a v nadobličkách oviec po ožiarení ^{60}Co .

MATERIÁL A METÓDY

Pozorovania sme vykonali na 21 ovciach plemena slovenské merino priemernej živej hmotnosti 34 kg, vo veku dvoch až troch rokov v období fyziologického anestrus. Zvieratá boli chované v štandardných podmienkach. Prvá skupina (šesť oviec) bola kontrolná. Ovce druhej skupiny (šesť kusov) boli ožiarené počas siedmich dní celkovou dávkou 6,7 Gy. Zdroj žiarenia bol ^{60}Co a dozimetria bola robená filmovými dozimetrami. Hodinový príkon zdroja žiarenia bol 0,039 Gy.

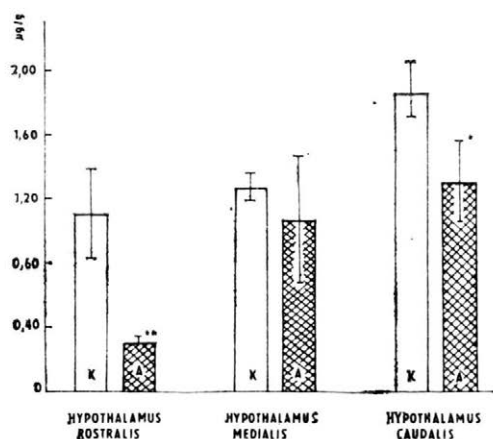
Ovce boli umiestnené v klietkach vo vzdialenosti od zdroja žiarenia 4,6 m. Ovce tretej skupiny boli ponechané na sledovanie mortality. Ihneď po zabíí zvierat sme vybrali z lebky mozog a rýchlo odobrali tkanivo z hypotalamu, ktorý sme priečnym anatomickým rezom rozdelili na tri časti — rostrálnu, mediálnu a kaudálnu. Aby sme zabránili 'degradačným zmenám, tkanivo sme ihneď po vybratí ponorili do kvapalného dusíka. Ďalšie vzorky tvorila hypofýza a nadobličky. Tkanivá sme homogenizovali v Potter-Elvehjemových homogenizátoroch a homogenáty sme centrifugovali pri 20 000 g/min po dobu 30 minút pri teplote 0 °C. Katecholamíny a L-DOPA sme z tkanivových supernatantov separovali chromatografiou na aktivovanom oxide hlinitom metódou podľa Antona a Sayreho (1972). Dopamín a 3,4-dihydroxyfenylalanín (L-DOPA) sme v eluátoch po adsorpčnej chromatografii stanovili metódou tých istých autorov. Pre vylúčenie fluorescence ostatných zložiek sme pre jednotlivé vzorky zhotovili aj tzv. interné a externé štandardy, tkanivové a reagenčné slepé skúšky. Výsledky sme vyjadrili v μg katecholamínov/g vlhkej hmotnosti tkaniva a štatisticky spracovali Studentovým t-testom.

VÝSLEDKY

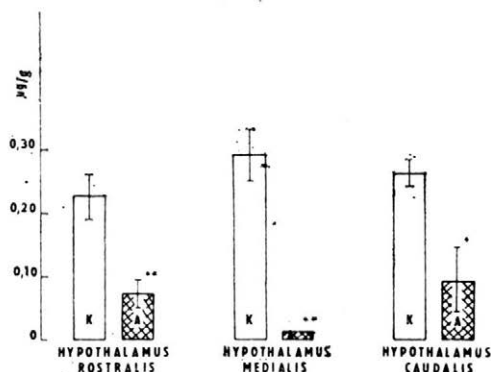
Výsledky udávame v grafoch na obr. 1—8. Po sedemdnšom celotelovom ožiarení oviec dávkou 6,7 Gy sme zistili pokles hladiny noradrenalínu (obr. 1) vo všetkých študovaných oblastiach hypotalamu, najvýraznejšie v rostrálnej (o 74,2) a v kaudálnej časti (o 40 %).

Koncentrácia dopamínu (obr. 2) sa znížila v celom hypotalame, najviac však v mediálnej (o 94 %) a rostrálnej (o 72,2 %) oblasti. Signifikantné zníženie hladiny dopamínu (o 60 %) sme zaznamenali aj v kaudálnom hypotalame ožiarených oviec. V kaudálnom hypotalame sme stanovili aj signifikantný pokles koncentrácie adrenalínu (obr. 3), ktorého hladiny sa v porovnaní s kontrolnými hodnotami znížili o 62,5 %. V súvislosti s poklesom koncentrácie katecholových amínov sa mení aj hladina L-DOPA (obr. 4), ktorá v hypotalame ožiarených oviec dosahuje podstatne nižšie hodnoty než u kontrolnej skupiny oviec. V rostrálnom hypotalame klesá hladina L-DOPA o 75,0 %, v mediálnom o 88,1 % a v kaudálnom hypotalame o 61,6 %. V hypofýze ožiarených oviec nedošlo k signifikantným zmenám hladín noradrenalínu a adrenalínu (obr. 5 a 7). Gama-žiarenie spôsobuje zníženie koncentrácie dopamínu v hypofýze o 75,2 % v porovnaní s kontrolnými hodnotami. Analogický pokles sme zaznamenali aj v zastúpení L-DOPA (o 83,4 %) v hypofýze (obr. 8). Celotelové ožiarenie oviec ^{60}Co spôsobuje aj pokles hladín katecholových amínov a L-DOPA v nadobličkách (obr. 5—8), ktorý je najvýraznejší u noradrenalínu (o 61,5 %). Hladina adrenalínu klesá v nadobličkách ožiarených zvierat o 33,4 % (obr. 8). Hladina dopamínu sa znižuje o 25,6 % (obr. 6) a L-DOPA o 21 % (obr. 7) v porovnaní s hodnotami kontrolnej skupiny.

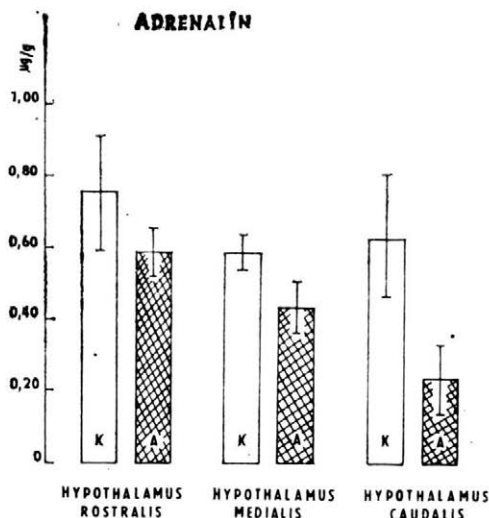
NORADRENALÍN



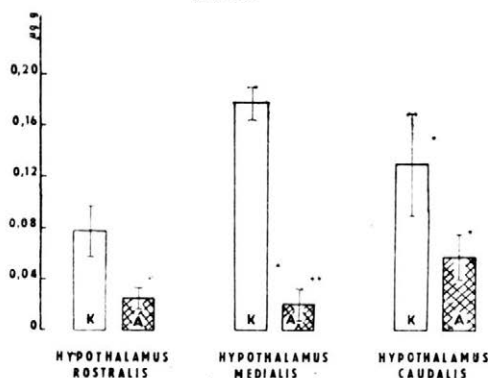
DOPAMÍN



ADRENALÍN



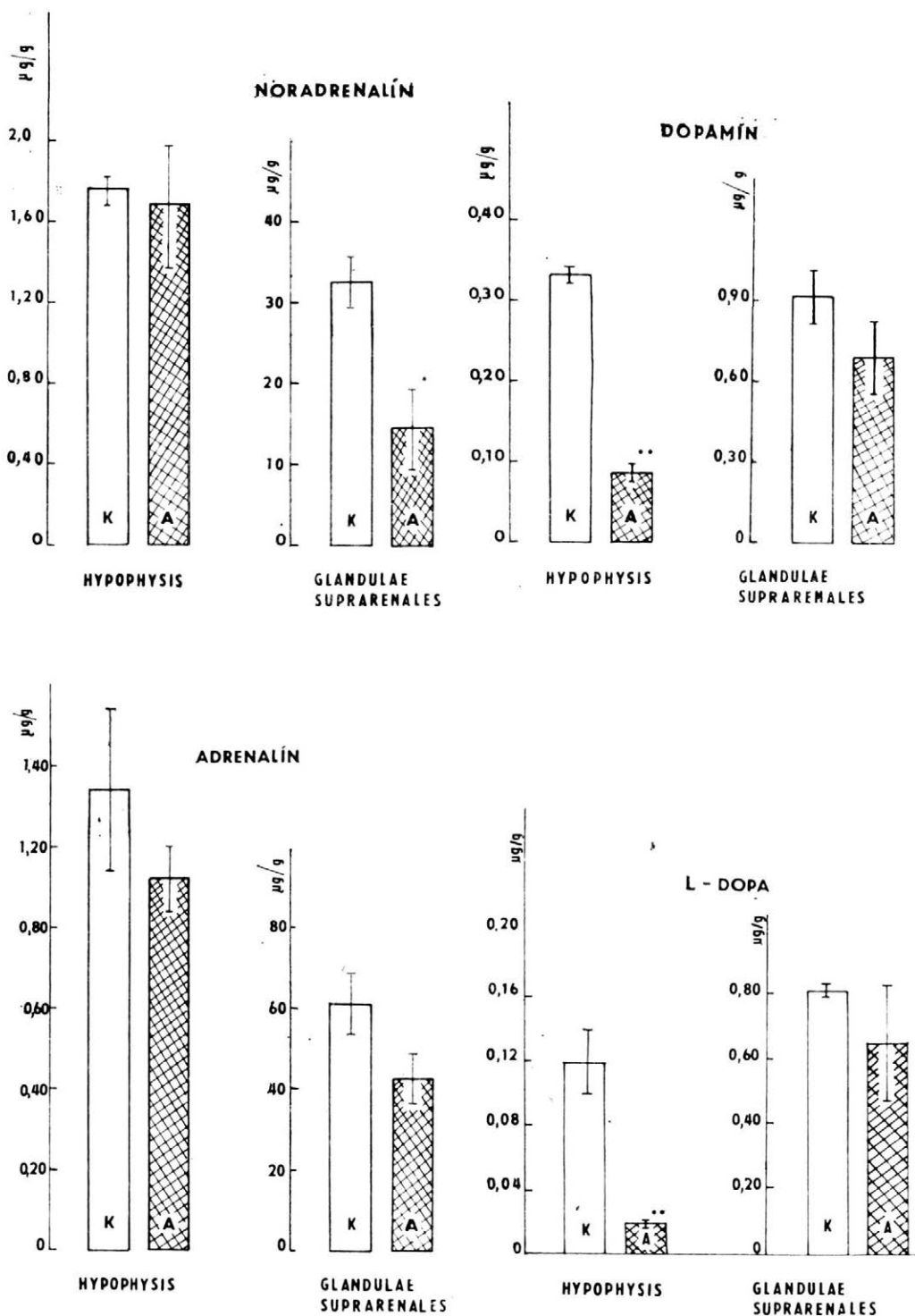
L-DOPA



1.—4. Vplyv gama-žiarenia na hladiny katecholových aminov (noradrenalinu, adrenalínu, dopaminu) a L-DOPA v hypotalame oviec. Výsledky sú vyjadrené v $\mu\text{g/g}$ vlhkej hmotnosti tkaniva a v aritmetických priemeroch $\pm$ S. E. M. [K—hladiny katecholových aminov po celotelovom sedemdnňovom ožiarení gama-lúčmi v celkovej dávke 6,7 Gy (700 R); ++ $P < 0,001$, + $P < 0,01$] — Influence of gamma-radiation on the levels of catecholamines (noradrenaline, adrenaline, dopamine) and L-DOPA in hypothalamus of sheep. The results are expressed in $\mu\text{g/g}$ of wet weight of tissue and in arithmetical means $\pm$ S. E. M. [K—levels of catecholamines after all-body seven-day irradiation by gamma rays at the total dose of 6.7 Gy (700 R); ++ $P < 0.001$, + $P < 0.01$]

DISKUSIA

Katecholamíny v hypotalame sa podieľajú na regulácii viacerých neuroendokrinných procesov [Jones a Hillhouse, 1976; Gannon, 1975]. Významná je účasť katecholamínov na regulácii pohlavných funkcií [Hökefelt a i., 1972] a na priebehu stresových reakcií



5.—8. Hladiny katecholových aminů v hypofýze a v nadobličkách ovčec po celotělové aplikaci gamma-žáření (symboly jako na obr. 1—4) — Levels of catecholamines in hypothalamus and adrenal glands of sheep after all-body application of gamma-radiation (symbols cf. Figs. 1 to 4)

(Kvetňanský, 1981). Katecholové amíny hypotalamu súčasne riadia aj uvoľňovanie hormónov neurohypofýzy — vazopresínu a oxytocínu, pričom noradrenalín pravdepodobne pôsobí ako inhibítor neurosekrécie. V oblasti mediobazálneho hypotalamu sa katecholové amíny podieľajú na regulácii hypotalamo-hypofyzárno-nadobličkového systému a na uvoľňovaní ACTH a kortikoidov (Ganong, 1975).

My sme po kontinuálnom ožiarení oviec dávkou 6,7 Gy zistili v hypotalame výrazné morfológické zmeny dotýkajúce sa poškodenia neurónov a endotelu tretej mozgovej komory (Rajtová a i., 1983), ako aj poklesu neurosekrečného materiálu, ktorý zrejme súvisí s poškodením endotelu ciev vplyvom žiarenia (Arendarčík a i., 1983). Ako vyplýva z našich výsledkov, dochádza u zvierat zaradených do toho istého pokusu aj k výraznému poškodeniu katecholaminergického systému hypotalamu. Nakoľko sa literárne údaje o vplyve ionizujúceho žiarenia na hladiny katecholových amínov v mozgu oviec vyskytujú ojedinele, môžeme naše výsledky porovnať len s pozorovaniami na laboratórnych zvieratách. Celotelové ožiarenie potkanov X-lúčmi narušuje metabolizmus a funkciu katecholových amínov v celom mozgu, hypotalame a v nadobličkách (Dahlstöm a i., 1973). Štepanovič a i. (1981) zistili výrazný pokles katecholových amínov v hypotalame, v *corpus striatum*, v srdci a v celom mozgu králikov a potkanov po celotelovom ožiarení X-lúčmi dávkou 650 a 850 R. Podobné výsledky sme v našom experimente dosiahli aj my, keď sme po dávke 6,7 Gy zaznamenali v hypotalame oviec štatisticky významné zníženie koncentrácie katecholových amínov a L-DOPA. Noradrenalín klesol vo všetkých oblastiach hypotalamu, najvýraznejšie v rostrálnej (o 74,2 %) a v kaudálnej časti (o 40 %). Hladiny dopamínu sa signifikantne znížili v hypotalame ožiarených oviec, najviac však v mediálnej (o 94 %) a v rostrálnej (o 72 %) časti. V kaudálnom hypotalame sme pozorovali pokles koncentrácie dopamínu (o 60 % v porovnaní s kontrolnou skupinou). Hladina adrenalínu poklesla v rostrálnom a mediálnom hypotalame v priemere o 30 % a v kaudálnom hypotalame ožiarených oviec o 62,5 %. V súlade s inými autormi (Dahlstöm a i., 1973) predpokladáme, že redukcia hladín katecholových amínov v hypotalame oviec môže súvisieť s narušením metabolických procesov v celom organizme a s poškodením endotelu ciev, ako aj s následným znížením, resp. obmedzením syntézy katecholových amínov. Tento predpoklad podporuje aj pokles prekursora pre syntézu katecholových amínov — 3,4-dihydroxyfenylalanínu (L-DOPA) v hypotalame ožiarených oviec, pozorovaný v našom experimente. Štepanovič a i. (1981) zistili, že ožiarené potkany sú schopné metabolizovať prekursor L-DOPA a uskladňovať nosyntetizované katecholové amíny v nervovom tkanive, keď je aktivita periférnej DOPA-dekarboxylázy inhibovaná benzenazidom.

Výrazný pokles hladín katecholových amínov sa po intraperitoneálnom podaní týchto látok 24 hodín pred ožiareními potkanov upravil na hladiny kontrolnej skupiny, čo by mohlo svedčiť o tom, že okrem porušeného metabolizmu dochádza po expozícii gama-žiareniu aj k poškodeniu mechanizmov vylučovania a uskladnenia katecholových amínov (Štepanovič a i., 1981). Okrem už uvedených faktov by pokles hladiny katecholových amínov, v našom pokuse pozorovaný v hypotalame i v iných tkanivách, mohol súvisieť so vzostupom aktivity ich

degradačného enzýmu monoamínooxidázy po ožiarení, ktorý sme pozorovali u tých istých zvierat (Pástorová a i., 1982). V zhode s údajmi citovaných autorov (Stepanovič a i., 1981; Dahlstöm a i., 1973) sme zistili pokles hladín katecholových amínov a L-DOPA v nadobličkách a hypofýze ožiarených oviec, pričom v hypofýze sa výraznejšie menia koncentrácie dopamínu a v nadobličkách sme zaznamenali signifikantný pokles noradrenalinu.

Ako vyplýva z dosiahnutých výsledkov, celotelové protrahované ožiarovanie oviec dávkou 6,7 Gy výrazne znižuje koncentráciu katecholových amínov v oblastiach, ktoré sú zapojené do regulačných mechanizmov gonadotropných funkcií, ako aj do riadenia viacerých neuroendokrinných procesov.

Literatúra

- ANTON, A. H. — SAYRE, D. F.: Fluorometric assay of catecholamines, serotonin and their metabolites. In: *Method in investigative endocrinology*. (Eds) RALL, J. E. — KOPIN, I. J. Amsterdam, London, North Holland Publishing Comp. 1972, s. 398-436.
- ARENDARČIK, J. — MARAČEK, I. — STANÍKOVÁ, A. — MOLNÁROVÁ, M. — TOKOŠ, M.: Vplyv ionizujúceho žiarenia na gonadotropnú funkciu a hypotalamo-hypofýzárneho systému u oviec. [Záverečná správa.] Košice, Vysoká škola veterinárna 1980.
- ARENDARČIK, J. — STANÍKOVÁ, A. — RAJTOVÁ, V. — MOLNÁROVÁ, M.: Zmeny v hypotalame u kontinuálne ožiarených oviec. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983, s. 519-527.
- DAHLSTÖM, A. — HÄGGENDAL, J. — ROSENBERG, B.: Catecholamines in hypothalamus of X-irradiated rats. *Acta radiol., Therapy*, 12, 1973, s. 191-200.
- GANONG, W. F.: Brain amines and the control of ACTH and growth hormone secretion. In: *Hypothalamic hormones*. New York, Academic Press 1975.
- HÖKFELT, T. — FUXE, K. — AJIKA, K. — LONSTRÖM, A.: Central catecholamine neurons and gonadotrophin secretion. *Proc. int. Cong. Endocrin., Washington* 1972.
- HRISTIČ, M. — PANTIČ, V.: Hypothalamic nuclei of rats after head irradiation and adrenocortical hormone treatment. *Int. J. Radiat. Biol.*, 26, 1974, s. 147-159.
- JONES, M. T. — HILLHOUSE, E. W.: Cellular and molecular bases of neuroendocrine processes. *Hung. Acad. Sci.*, 1976, s. 461-482.
- KVETŇANSKÝ, R.: Recent progress in catecholamines under stress. In: *Catecholamine and stress. Recent Advances*. (Eds) USDIN, E. — KVETŇANSKÝ, R. — KOPIN, I. J. New York, Amsterdam, Oxford, Elsevier North Holland 1981.
- PÁSTOROVÁ, B. — ARENDARČIK, J. — MOLNÁROVÁ, M.: Hladina katecholových amínov a aktivita monoamínooxidázy po ožiarení. In: *Zbor. prác z celoštát. rádiobiologickej konf.*, Starý Smokovec, 1982, s. 72-75.
- RAJTOVÁ, V. — STANÍKOVÁ, A. — ARENDARČIK, J. — LUŠTIK, J. — BRIANIČIN, J.: Suprachiazmatická a infundibulárna časť tretej mozgovej komory u kontinuálne ožiarených oviec. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983, s. 419-425.
- STANÍKOVÁ, A. — ARENDARČIK, J. — TOKOŠ, M. — BALUN, J. — CHLEBOVSKÝ, O.: Karyometrické zmeny neurónov jadier hypotalamu a ependýmu tretej mozgovej komory oviec po podaní Gn-RH a následnom ožiarení. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983, s. 529-539.
- STEPANOVIC, S. R. — NIKOLIČ, J. V. — VARAGIČ, V. M.: The effect of L-DOPA and benserazide on the amount of catecholamines in heart atria, hypothalamus and corpus striatus of X-irradiated rats. In: *Catecholamines and stress. Recent Advances*. (Eds) USDIN, E. — KVETŇANSKÝ, R. — KOPIN, I. J. New York, Amsterdam, Oxford, Elsevier North Holland 1981.

Došlo dňa 4. 2. 1985

ПАСТОРОВА, Б. — АРЕНДАРЧИК, Й. — МОЛНАРОВА, М. (Институт ветеринарии, Кошице): Уровни катехоловых аминов в гипоталамусе, гипофизе и надпочечниках овец после сплошного облучения гамма-лучами. *Veter. Med.*, (Praha), 30, 1985 (8) : 485-492.

Определяли изменения уровней катехоловых аминов и L-DOPA в регулирующей системе воспроизводственного цикла (гипоталамус, гипофиз) и в надпочечниках овец после их сплошного облучения ^{60}Co общей дозой 6,7 Gy в течение 7 дней. Почасовой привод источника облучения = 0,039 Gy. Катехоловые амины (норадреналин, допамин и адреналин) и L-DOPA определяли после их изолирования из тканей по методу спектральной флуориметрии. После сплошного облучения гамма-лучами норадреналин убывал в гипоталамусе по сравнению с контролем заметнее всего в ростральной (на 74,2 %) и каудальной (на 40 %) партиях. Также концентрации допамина убывали на 72 % в ростральном гипоталамусе, на 94 % в медиальном и на 60 % в каудальном. Адреналин заметно всего убывает в каудальной области гипоталамуса (на 62 %). В связи с этим меняется и уровень прекурсора для синтеза этих аминов L-DOPA, который достигает в этих партиях гораздо более низких значений, чем у контроля. В гипофизе значимых изменений не отмечено у норадреналина и адреналина, но заметно понизились допамин и L-DOPA ($P < 0,01$). Гамма-лучи вызывают также понижение концентраций катехоловых аминов и L-DOPA в надпочечниках, главное норадреналина (на 61 %). На основе этих результатов делается вывод, что сплошное облучение дозой 6,7 Gy вызывает у овец заметное понижение катехоловых аминов в гипоталамусе, гипофизе в надпочечниках, что связано, по-видимому, с расстройством синтеза и деградацией катехоламинов, а также с общим повреждением организма.

катехоламины; норадреналин; адреналин; допамин; L-DOPA; спектрофлуориметрический метод

PÁSTOROVÁ, B. — ARENDARČIK, J. — MOLNÁROVÁ, M. (University of Veterinary Medicine, Košice): Levels of Catecholamines in Hypothalamus, Hypophysis and Adrenal Glands of Sheep after All-Body Exposition to Gamma-Radiation. *Veter. Med.* (Praha), 30, 1985 (8) : 485-492.

The changes were studied in the levels of catecholamines and L-DOPA in the control system of reproduction cycle (hypothalamus, hypophysis) and in adrenal glands of sheep after all-body irradiation with ^{60}Co at the total dose of 6.7 Gy for seven days. The power input per hour of irradiation source was 0.039 Gy. The catecholamines (noradrenaline, dopamine and adrenaline) and L-DOPA were determined, after having been isolated from the tissues, by the method of spectral fluorimetry. After all-body exposition to gamma-radiation noradrenaline dropped in hypothalamus in comparison with the control group of sheep, most significantly in the rostral (by 74.2 %) and caudal part (by 40 %). A similar drop like in the case of noradrenaline was also observed in dopamine, the concentrations of which decreased in rostral hypothalamus by 72 %, in medial hypothalamus by 94 % and in caudal hypothalamus by 60 %. Adrenaline shows a drop in hypothalamus, most significant in caudal region (by 62 %). In relation with that the level of a precursor for the synthesis of catecholamines and L-DOPA has been changed which achieved, in the studied regions of hypothalamus in sheep, significantly lower levels than were determined in the control group of sheep. As regards the hypophysis, after irradiation no significant changes in the levels of noradrenaline and adrenaline were recorded, however, dopamine and L-DOPA dropped significantly ($P < 0.01$). The exposition to gamma-radiation also causes a decrease in the concentrations of catecholamines and L-DOPA in the adrenal glands of sheep, most significant in noradrenaline (by 61 %). On the basis of the results we presume that the all-body irradiation of sheep by a dose of 6.7 Gy results in a significant decrease in the content of catecholamines in hypothalamus, hypophysis and adrenal glands, which is probably in relation with the failure of synthesis and degradation of catecholamines and with the total organism injury.

catecholamines; noradrenaline; adrenaline; dopamine; L-DOPA; spectrofluorimetric method

PÁSTOROVÁ, B. — ARENDARČIK, J. — MOLNÁROVÁ, M. (Veterinärmedizinische Hochschule, Košice): *Katecholaminspiegel im Hypothalamus, in der Hypophyse und in den Nebennieren von Schafen nach gesamtkörperlicher Exposition der Gamma-Strahlung*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 485-492.

Wir studierten Veränderungen der Katecholamin- und L-DOPA-Spiegel im Steuerungssystem des Reproduktionszyklus (Hypothalamus, Hypophyse) und in der Nebenniere von Schafen nach gesamtkörperlicher Bestrahlung von ^{60}Co durch eine Gesamtdosis von 6,7 Gy im Verlauf von 7 Tagen. Die Stundenleistung der Strahlungsquelle betrug 0,039 Gy. Die Katecholamine (Noradrenalin, Dopamin und Adrenalin) und L-DOPA wurden nach ihrer Isolierung aus den Geweben mittels Spektrofluorimetrie bestimmt. Nach der Gesamtkörperexposition der Gammastrahlung sank das Noradrenalin im Hypothalamus der Schafe gegenüber der Kontrollgruppe, am ausgeprägtesten im Rostral- (um 74,2 %) und im Kaudalteil (um 40 %). Einen analogen Rückgang wie beim Noradrenalin, konnten wir ebenfalls in der Vertretung des Dopamins verzeichnen, dessen Konzentrationen im Rostralabschnitt des Hypothalamus um 72 %, im medialen um 94 % und im kaudalen Hypothalamus um 60 % sanken. Das Adrenalin weist im Hypothalamus einen Rückgang auf, der sich am markantesten im Kaudalgebiet (um 62 %) abzeichnet. Im Zusammenhang damit ändert sich auch das Niveau des Präkursors für die Synthese der Katecholamine und L-DOPA, der in den untersuchten Hypothalamusregionen der Schafe weit niedrigere Niveaus erreichte als die, die wir bei der Kontrollschafgruppe verzeichneten. In der Hypophyse kam es nach der Bestrahlung zu keinerlei bedeutenden Veränderungen der Noradrenalin- und Adrenalinspiegel, während das Dopamin und L-DOPA signifikant sanken ($P < 0,01$). Die Exposition der Gamma-Strahlung hat auch einen Rückgang der Konzentrationen der Katecholamine und L-DOPA in den Nebennieren der Schafe zur Folge, am markantesten beim Noradrenalin (um 61 %). Aufgrund der ermittelten Ergebnisse nehmen wir an, daß eine Gesamtkörperbestrahlung von Schafen durch eine Dosis von 6,7 Gy einen wesentlichen Rückgang des Katecholaminegehalts im Hypothalamus, in der Hypophyse und in den Nebennieren verursacht, was wahrscheinlich mit einer Störung der Synthese und Katecholamindegradation sowie mit einer Gesamtschädigung des Organismus zusammenhängt.

Katecholamine; Noradrenalin; Adrenalin; Dopamin; L-DOPA; spektrofluorimetrische Methode

Adresa autorov:

RNDr. Bernádetta Pástorová, CSc., MVDr. Jozef Arendarčík, DrSc., ing. Marie Molnárová, CSc., Vysoká škola veterinárska, Komenského 73, 041 81 Košice

J. Štill, J. Konrád

ŠTILL, J. — KONRÁD, J. (Vysoká škola veterinární, Brno): *Využití akupunktury k resuscitaci zvířat*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 493-500.

Předložená práce shrnuje základní zkušenosti s realizací akupunkturní resuscitace zvířat. Výsledky se opírají o šetření na 243 případech 17 různých druhů domácích i exotických savců a ptáků. Apnoický stav, popř. jen hlubokou narkózu, jsme navodili použitím různých druhů narkotin, především Thiopentalu. Práce podává přehled čtyř nejúčinnějších akupunkturních bodů a objasňuje vlastní způsob resuscitace. Akupunkturní resuscitace má až 100% výsledky u psů klinicky zdravých, u zvířat stížených různými chorobnými stavy byla úspěšnost zásahu menší (77,47 %). U 15 zoozvířat v medikamentózní operační narkóze dosáhla resuscitační účinnost 92,6 %. Resuscitační efekt je dán nejen přísně stanovenými body, ale i difúzním drážděním příslušného bodu a jeho okolí formou akupresury. Diskuse se zabývá faktory, na nichž je akupunkturní resuscitace a její úspěšnost závislá.

akupunktura; akupresura; domácí a exotická zvířata

Ve veterinární medicíně se v případě potřeby běžně používají známé resuscitační medikamentózní a fyzikální postupy. Relativně nejčastěji jich používáme — v souladu se soudobými znalostmi o zákonitostech vzniku a vývoje kolapsových a šokových stavů — v těch indikacích, které se vyvíjejí hlavně jako možné komplikace medikamentózní narkózy, ale i v dalších situacích, například při odchycích volně žijících zvířat a podobně.

V posledních letech se ve veterinární odborné literatuře stále častěji setkáváme s příspěvky zabývajícími se využitím akupunktury nebo jejích principů v resuscitaci zvířat. Tak například Janssens aj. (1979) popisují úspěšné použití bodu JENG CHUNG (Gv-26 v anglickém značení) a Ki-1 u 69 psů a koček, u nichž došlo během hluboké medikamentózní narkózy k zástavě dechu, popř. i srdeční činnosti. Učebnice veterinární akupunktury popisují možnost použití hlavně bodu Gv-26 i u skotu, prasat a koní (Klode a Kung, 1977; Plachotín, 1966).

Experimentálně byly na psech v halotanové narkóze potvrzeny sympatikomimetické účinky bodu Gv-26 na kardiovaskulární aparát těchto zvířat (Lee aj., 1977). Tyto účinky byly vyblokovatelné β -blokátory (Propanolon), méně α -adrenergními blokátory (Phentolamin).

V uplynulých dvou letech jsme se na pracovišti I. interní kliniky KDTP Vysoké školy veterinární v Brně zabývali klinickým i experimentálním ověřením resuscitačního účinku vybraných akupunkturních bodů na různých druzích domácích zvířat a zvířat chovaných v zoologické zahradě. Cílem našeho výzkumu bylo zjistit, zda je tato metoda vhodná i pro praktické využití.

MATERIÁL A METODA

Resuscitační akupunkturní body jsme ověřovali celkem na 17 druhích zvířat, z toho u 12 domácích a u pěti druhů exotických zvířat. 15 druhů patřilo do třídy savců, dva druhy do ptáků. Celkem jsme měli v pokuse 243 zvířata.

K navození delšího apnoického stavu — v menším procentu případů jen hluboké narkózy třetího stupně — jsme použili několika různých narkotik (barbituráty, éter, halotan, disociativní narkotikum ketamin, analog morfinu etorfin). V 90 % případů jsme pracovali s Thiopentalem, který se vyznačuje silně tlumivým účinkem na dechové centrum v prodloužené míše.

U skupiny 100 psů jsme rychle intravenózně aplikovali Thiopental v dávce 15 až 60 mg/kg živé hmotnosti tak, aby nastala delší apnoická pauza (půl až dvě minuty). Tato dávka byla přísně individuální podle současného klinického stavu zvířat, který jsme zjistili před pokusem.

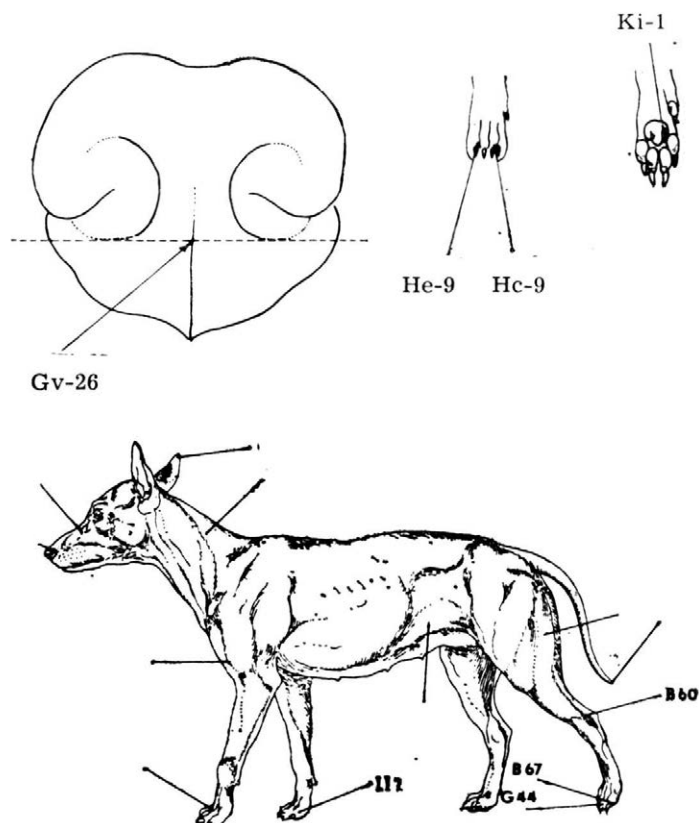
Z akupunkturních bodů jsme používali Gv-26, Ki-1, He-9, Hc-9, bod špičky ušního boltce Erchien a bod konce ocasu Woeichien. Nejužívanější a neúčinnější čtyři akupunkturní body jsou detailněji zakresleny na obr. 1. Z nespecifických kontrolních bodů (placebo-bodů) jsme použili některé akupunkturní body, které by neměly mít vztah k aktivaci potlačené dechové činnosti, a některé neakupunkturní body (obr. 2). Celkem jsme těchto bodů použili u 30 psů.

Vlastní resuscitaci jsme dělali silným zavedením běžně používané injekční jehly do bodu a její rotací až do doby, kdy se objevila pravidelná dechová činnost.

Po minutě pravidelného dýchání jsme zvýšili dávku Thiopentalu a znovu — nyní již po kratší době trvání apnoe — jsme stimulovali bod. To jsme opakovali podle možnosti až do úplného apnoe, akupunkturně již neovlivnitelného.

U 42 % psů s různým orgánovým nálezem byla provedena patologicko-anatomická pitva.

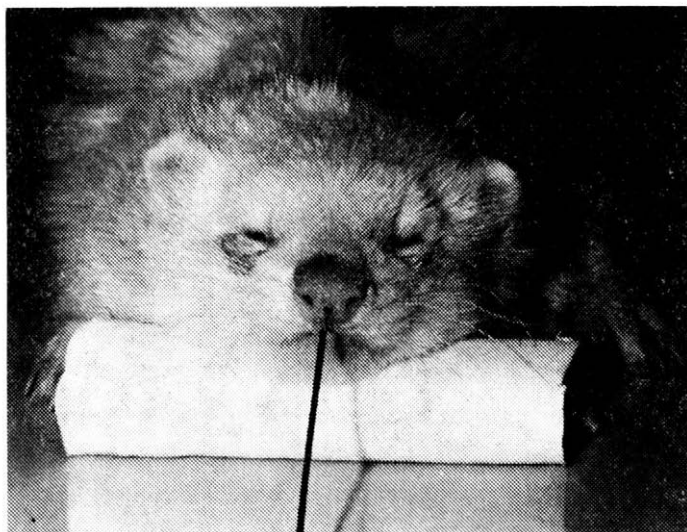
U dalších druhů zvířat jsme dělali akupunkturní resuscitaci obdobně nebo jen při hluboké depresi dechu (obr. 3—5).



1. Schematické znázornění lokalizace důležitých resuscitačních bodů u psa — Schematic representation of localization of important resuscitation points in dogs

2. Nespecifické kontrolní body — Nonspecific control points

3. Jehlová akupunktura
Gv-26 u fretky —
Needle acupuncture Gv-
-26 in ferret



4. Jehlová akupunktura
Gv-26 u kočkodana ze-
leného — Needle acu-
puncture Gv-26 in
green monkey



5. Pozice Gv-26 u přežvýkavců — Gv-26 position in
ruminants



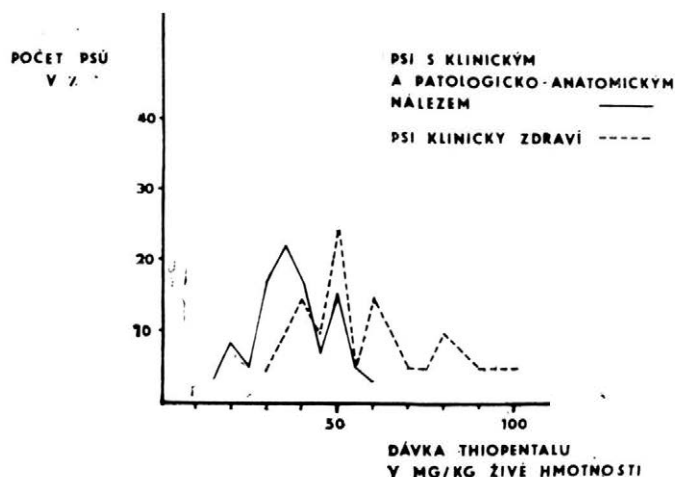
Počet vyšetření	Psi s klinickým a patologicko-anatomickým nálezem		Psi klinicky zdraví		Celkem psů	
	kusů	%	kusů	%	kusů	%
Celkem psů ve skupině	79	100	21	100	100	100
Rozdýcháno	61	77,47	21	100	82	82
Nerozdýcháno	18	22,53	—	—	18	18

VÝSLEDKY

Z tab. I, která zachycuje úspěšnost použití akupunktury v resuscitaci psů, vidíme, že zásah byl výrazně úspěšnější u skupiny klinicky zdravých psů (100 %) než u skupiny psů s klinickými příznaky určitého chorobného procesu, doloženými patologicko-anatomickým nálezem (77,47 %). Tuto tendenci potvrzuje i obr. 6, v němž je vyjádřena závislost obnovy dechové činnosti u psů na dávce Thiopentalu. Z obr. 6 vidíme, že u klinicky zdravých psů se proti druhé skupině psů s klinickými příznaky onemocnění a patologicko-anatomickým nálezem resuscitace dařila lépe i při vyšších dávkách Thiopentalu.

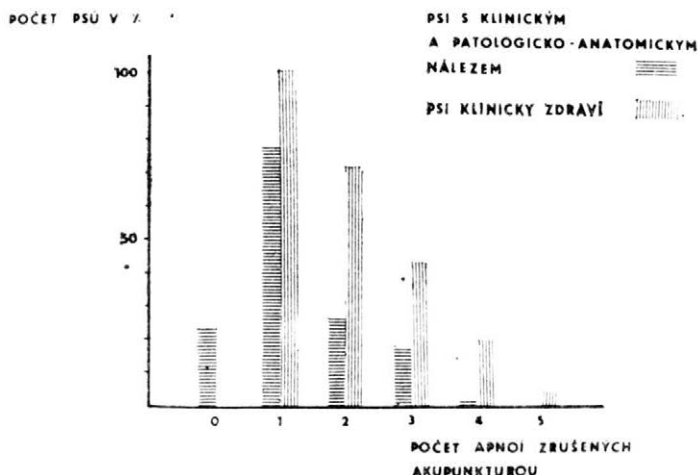
Obr. 7 zachycuje závislost počtu úspěšně obnovených dechových činností na postupně zvyšované dávce Thiopentalu u psů obou skupin. Můžeme zde pozorovat, že klinicky zdravé psy se dařilo úspěšně opakově rozdýchat ve větším procentu než psy s klinickými projevy onemocnění. U první skupiny se podařilo obnovit zastavenou dechovou činnost v průměru na jednoho psa 2,38krát, u druhé skupiny jen 1,026krát.

Ze sledovaných akupunkturních bodů můžeme jako nejúčinnější a nejspolehlivější označit bod JENG-CHUNG (Gv-26; obr. 8). V průměru se jím dařila resuscitace při vyšších dávkách aplikovaného Thiopentalu



6. Závislost obnovy dechové činnosti u psů na dávce Thiopentalu — Dependence of respiration resumption in dogs on the Thiopental dose

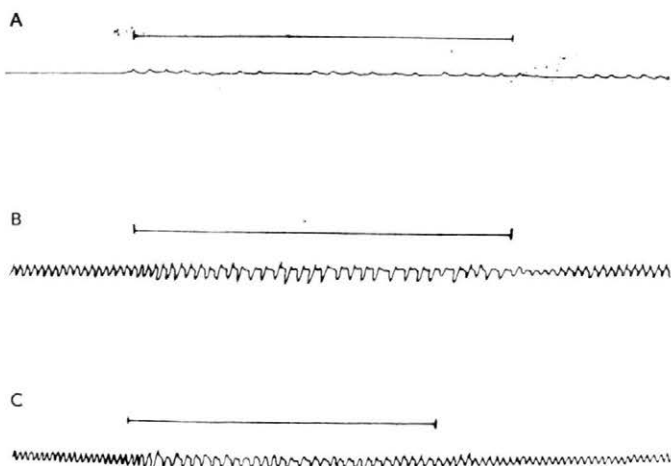
7. Závislost počtu úspěšně obnovených dechových činností na postupně zvyšované dávce Thiopentalu — Dependence of the number of successfully resumed respiratory activities on the gradually increased dose of Thiopental

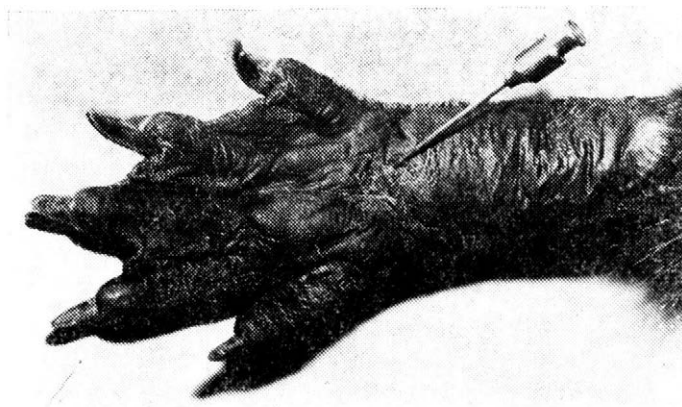


8. Stimulace bodu Jeng-Chung (Gv-26) u psa jehlou — Needle stimulation of Jeng-Chung (Gv-26) point in the dog



9. Kymografický záznam dechové činnosti nutrie v hluboké thiopentalové narkóze. Záznam A: obnova dechu po jehlové stimulaci Gv-26. Záznam B: výrazné zpomalení a prohloubení dechu po akupresuře Gv-26. Záznam C: normalizační vliv akupresury Gv-26 na tachypnoe vyvolané intrakardiální aplikací noradrenalinu — Kymographic record of respiratory activity of coypu in deep Thiopental narcosis. Record A: respiration resumption after needle stimulation Gv-26. Record B: marked slowing down and deepening of respiration after acupressure Gv-26. Record C: normalizing influence of acupressure Gv-26 on tachypnoea induced with intracardial application of noradrenaline





10. Jehla v bodu Ki-1 u nutrie. Bod je uložen mezi druhým a třetím metatarzem, vpich se vede z plantární strany chodidla, jehla se zavádí silně směrem k drápkům a dorzálně — Needle in Ki-1 point in coypu. The point is between the second and third metatarsus, the prick is performed from the plantar side of the sole, the needle is inserted strongly towards claws and dorsally

lépe než u jiných bodů. Celkem 13krát jsme jím obnovili zastavenou dechovou činnost i tam, kde stimulace jiných bodů byla neúspěšná.

I u ostatních druhů zvířat jsme zjistili, že akupunkturní resuscitace je úspěšná. Například u sedmi druhů zoozvířat v počtu 15 jedinců stimulace akupunkturních bodů Gv-26 a Ki-1 (jehlovou stimulací i akupresurou) podstatně ovlivnila dechovou činnost, a to převážně ve smyslu prohloubení dechu a snížení dechové frekvence. Tato zvířata byla v medikamentózní operační narkóze, úspěšnost zásahu dosáhla 92,6 %.

U mnoha druhů byla velmi účinná akupresura akupunkturních bodů. Na obr. 9 vidíme kymografický záznam dechové činnosti nutrie v hluboké thiopentalové narkóze. Na záznamu A je zachycena obnova dechu po stimulaci jehlou, na záznamu B výrazné zpomalení a prohloubení dechu po akupresuře a konečně i překvapivý vliv akupresury (záznam C) na tachypnoe vyvolané intrakardiální aplikací noradrenalinu. Opět poklesla dechová frekvence (o 40 %) a prohloubil se dech. Když stimulace skončila, dechová frekvence se téměř vrátila k hodnotám před akupresurou.

Nespecifické kontrolní body (obr. 2) v oblasti dorzální krční svaloviny, kaudálních svalů stehna a plece dechovou činnost neovlivňovaly, naopak body na akrálních částech těla se zdají být klinicky často podobně účinné jako resuscitační body dané oblasti, což platí zvláště o nespecifických bodech na nose. Při přesnějším kymografickém záznamu však bývá vliv akupunkturních bodů zřetelnější.



11. Jehla v bodu He-9 u nutrie. Bod je lokalizován na vnitřní straně pátého prstu hrudní končetiny z dorzální strany, v kožním valu při výstupu drápu. Obdobně na vnitřní straně třetího prstu této končetiny je lokalizován bod He-9. Oba vpichy se vedou kolmo k okostici — Needle in He-9 point in coypu. The point is localized on the inner side of the fifth toe of pectoral limb from dorsal part, in the skin wall at claw. Similarly, the He-9 point is localized on the inner side of the third toe of pectoral limb. Both pricks point perpendicularly towards periosteum

Také statistické hodnocení na hladině spolehlivosti $P < 0,05$ potvrdilo významný rozdíl v resuscitační úspěšnosti akupunktury a nespecifických kontrolních bodů u psů.

DISKUSE

Naše výsledky potvrzují literaturou uváděný stimulační vliv akupunktury na potlačenou či zastavenou dechovou činnost u zvířat.

Zdá se, že stimulace akrálních částí těla do značné míry působí na potlačenou dechovou činnost. Z dosavadních výsledků plyne, že silná stimulace nemusí být přísně bodová, účinné je i difúznější, a tedy plošně méně specifické dráždění formou akupresury (obr. 9).

Úspěšnost resuscitace akupunkturou je závislá na mnoha faktorech: na druhu zvířete, jeho individuální predispozici včetně aktuálního zdravotního stavu, typu, hloubce a provedení narkózy, výběru stimulačních bodů, způsobu stimulace a další.

V souladu se současnými poznatky o vzniku, rozvoji a průběhu šoku [Mikulica, 1983; Musil, 1981] můžeme na základě našich poznatků konstatovat, že akupunkturní resuscitace má naději na úspěch — podobně jako ostatní resuscitační postupy — tam, kde jde jen o reverzibilní kolapsové stavy (převážně vagového původu) nebo o reverzibilní stadia časného šoku. Z tohoto hlediska je výrazně nižší naděje na úspěch u jedinců s rozvinutými orgánovými změnami zánětlivého či degenerativního charakteru (tab. I, obr. 6, 7).

Ve veterinární medicíně se akupunkturní resuscitace projevuje jako dostatečně účinná, bezpečná, na materiální vybavení i provedení nenáročná metoda. Zvláště v terénních podmínkách, kde není možnost zavést řízené dýchání, je jí možno s úspěchem použít, a to buď samostatně, nebo spolu s dalšími používanými resuscitačními postupy.

Literatura

- JANSENS, L. — ALTMAN, S. — ROGERS, P. A. M.: Respiratory and cardiac arrest under general anaesthesia: Treatment by acupuncture of the nasal philtrum. *Veter. Rec.*, 105, 1979, s. 273-276.
- KLIDE, A. M. — KUNG, S. H.: *Veterinary acupuncture*. University of Pennsylvania Press, 1977, s. 211-231.
- LEE, D. C. — YOON, D. S. — LEE, M. O. — CLIFFORD: Some effects of acupuncture at Jeng Chung (Go-26) on cardiovascular dynamics in dogs. *Can. J. comp. Med.*, 41, 1977, s. 446-454.
- MIKULICA, V.: Pathomorfologické Veränderungen beim psychogenen Tod der Zootiere. *Verh. Ber. Erkr. Zootiere*, 25, 1983, s. 221-230.
- MUSIL, J.: *Základy biochemie chorobných procesů*. Praha, Avicenum 1981.
- PLACHOTIN, M. V.: *Iglotěrapija v vetěrinarii*. Moskva, Kolos 1966.

Došlo dne 12. 7. 1984

ШТИЛЛ, Я. — КОНРАД, Я. (Институт ветеринарии, Брно): Акупунктура в реанимации животных. *Veter. Med.*, (Praha), 30, 1985 (8) : 493-500.

В работе обобщается основной опыт в области реанимации животных с помощью акупунктуры. Данные исходят из обследования 243 случаев среди 17 видов домашних и экзотических животных и пернатых. Апноическое состояние или же глубокий наркоз вызывали с помощью разных наркотиков, главное Тиопентала. В работе приводятся 4 самых эффектив-

ных точек для акупунктуры и способ реанимации, которая дает и 100% результаты у клинически здоровых собак; но у пораженных разными болезненными состояниями животных этот процент ниже: 77,74%. У 15 зооживотных, находящихся в медикаментозном операционном наркозе, этот процент составил 92,6%. Эффект дан не только строго ограниченными точками, но и диффузным раздражением данной точки и ее периферии в форме акупрессуры. В дискуссии рассматриваются факторы, от которых зависит успешность такой акупунктуры.

акупунктура; акупрессура; домашние и экзотические животные

ŠTILL, J. — KONRÁD, J. (University of Veterinary Medicine, Brno): *The Use of Acupuncture for Resuscitation of Animals*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 493-500.

In the present work fundamental experience is summed up regarding the acupuncture resuscitation of animals. The results are based on examination of 243 cases of 17 different species of domestic and exotic animals and birds. The apnoea condition, or only deep narcosis, has been induced with the use of different kinds of narcotics, above all Thiopental. A review of four most effective acupuncture points and the proper way of resuscitation are given. The acupuncture resuscitation has shown up to 100% results in clinically healthy dogs, whereas in animals affected with different diseases the success of intervention showed to be smaller (77.74%). In zooanimals in narcosis induced by medicines, the resuscitation effectiveness achieved 92.6%. The resuscitation effect is based not only on strictly determined points but also on diffusive irritation of respective point and its surroundings by acupressure. Discussion deals with the factors on which the acupuncture resuscitation and its success are dependent.

acupuncture; acupressure; domestic and exotic animals

ŠTILL, J. — KONRÁD, J. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): *Einsatz der Akupunktur zur Wiederbelebung von Tieren*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 493-500.

Die vorliegende Arbeit faßt die grundsätzlichen Erfahrungen mit der Realisation der Akupunktur-Wiederbelebung bei Tieren zusammen. Die Ergebnisse stützen sich auf Untersuchungen von 243 Fällen bei 17 verschiedenen Arten von Haus- und exotischen Tieren und Vögeln. Den apnoischen Zustand, bzw. nur eine tiefe Narkose, führten wir durch Anwendung verschiedener Narkosemittel, insbesondere Thiopental, herbei. Die Arbeit bringt eine Übersicht über die wirksamsten vier Akupunkturpunkte und die eigentliche Wiederbelebungsmethode. Die Akupunktur-Wiederbelebung weist eine nahezu 100%ige Erfolgsrate bei klinisch gesunden Hunden auf, bei durch verschiedene Krankheiten befallenen Tieren war der Erfolg der Behandlung etwas geringer (77,74%). Bei 15 Zootieren in medikamentöser Operationsnarkose erreichte die Wiederbelebungswirksamkeit 92,6%. Der Wiederbelebungseffekt basiert nicht nur auf den streng festgesetzten Punkten, sondern auch auf einer diffusen Reizung des betreffenden Punktes und seiner Umgebung in Form von Akupressur. Die Diskussion befaßt sich mit den Faktoren, von denen die Akupunktur-Wiederbelebung und ihre Erfolgsrate abhängig ist.

Akupunktur; Akupressur; Haus- und exotische Tiere

Adresa autorů:

MVDr. Jaroslav Štill, prof. MVDr. Jaroslav Konrád, DrSc., Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

EFEKTIVNOST POVRCHOVÉ FIXAČNÍHO TESTU V DIAGNOSTICE BRUCELÓZY ZAJÍCŮ

R. Handl

HANDL, R. (Státní veterinární ústav Olomouc): *Efektivnost povrchové fixačního testu v diagnostice brucelózy zajíců*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 501-505.

V průběhu dvou let byla ověřována spolehlivost povrchové fixačního testu v diagnostice brucelózy zajíců na 961 vzorcích zaječí krve, odebraných na honcích ve vybraných lokalitách okresu Olomouc. Ze 33 sérologicky pozitivních zajíců bylo 29 reagentů podrobeno komplexnímu laboratornímu vyšetření na brucelózu. Ve všech případech byla brucelóza potvrzena patologicko-anatomicky, kultivačně u 78,95 % bakteriologicky vyšetřených zajíců a ve zbývajících případech biologickým pokusem na morčatech. Dosažené výsledky potvrdily, že povrchové fixační test představuje vysoce efektivní metodu pro spolehlivou sérologickou diagnostiku brucelózy zajíců.

spolehlivá sérologická metoda; krev; komplexní laboratorní vyšetření

Otázka epizootologické souvislosti mezi brucelózou prasat a brucelózou zajíců je předmětem studia odborníků již delší dobu. I když tato problematika není zcela definitivně vyřešena, byly v posledních třech desetiletích v cizí i naší odborné literatuře nashromážděny argumenty, které nasvědčují tomu, že mezi brucelózou prasat a brucelózou zajíců epizootologická souvislost opravdu existuje. Je to především skutečnost, že — pokud jde o původce nákazy, bakteriální druh *Brucella suis* — dominuje téměř v celé evropské oblasti, zejména pak ve střední Evropě jak u prasat, tak i u zajíců stejný biovar, a to biovar 2 (Thomsen). To potvrzují některé práce autorů ze sousedních států, např. z Polské lidové republiky (Iwanow a Tropilo, 1966; Losinksi aj., 1972), z Německé demokratické republiky (Fenske a Pulst, 1973; Dedeck, 1979), ze Spolkové republiky Německo (Englert aj., 1964), z Rakouska (Willingner, 1960), z Maďarské lidové republiky (Kardavan a Kemenes, 1961) a z mnoha dalších evropských zemí.

Plně to potvrzují i naše vlastní zkušenosti. Ve třech ohniscích brucelózy prasat, na jejichž odhalení a likvidaci se naše pracoviště v posledních 13 letech účinně podílelo, byla u abortovaných plodů od zmetavších prasnic a u zajíců z okolních oblastí postižených chovů prasat zjištěna *Brucella suis*, biovar 2. O tomto důležitém nálezu v jednom ohnisku výskytu brucelózy u prasat jsme informovali veterinární veřejnost v časopise Veterinářství (Handl a Beneš, 1974).

Nedílnou součástí rychlé a spolehlivé laboratorní diagnostiky brucelózy zajíců, zejména u hromadných depistáží v ohniscích výskytu

brucelózy prasat a v jejich okolí nebo během prověřování celkové epizootologické situace ve výskytu brucelózy u zajíců ve vybraných oblastech, je sérologická diagnostika.

V roce 1972 uveřejnili Matoušek a Františková novou sérologickou metodu, použitelnou v rutinní diagnostice brucelózy zajíců — tzv. povrchově fixační test. Tato publikace byla pro nás podnětem k tomu, abychom prověřili spolehlivost této sérologické metody, obzvláště po nedobrych zkušenostech s rychlou sklíčkovou aglutinací, kterou jsme používali v diagnostice brucelózy zajíců do roku 1972.

MATERIÁL A METODY

Abychom prověřili pracnost, spolehlivost a použitelnost povrchově fixačního testu v rutinní sérologické diagnostice brucelózy zajíců, vyšetřili jsme v letech 1973 a 1974 touto metodou 961 vzorků zaječí krve, odebraných na honech ve vybraných lokalitách okresu Olomouc.

K provedení testu bylo použito komerčního antigenu *Brucella suis* k rychlé sklíčkové aglutinaci, výrobce Bioveta, n. p. Ivanovice na Hané, a Whatmanova filtračního papíru. Obdélník tohoto filtračního papíru o rozměrech 5 X 20 cm sloužil k vyšetření deseti vzorků krve. Vlastní pracovní postup byl tento: Po centrifugaci vyšetřovaných vzorků zaječí krve jsme na obdélník Whatmanova filtračního papíru, jenž byl na horním okraji označen pořadovými čísly vzorků, nanесли sterilními Pasteurovými pipetami kapku jednotlivých vzorků krevních sér, a to přibližně ve vzdálenosti 2 cm od spodního okraje papíru. Do centra rozpitých kapek krevního séra jsme pak po důkladném protřepání brucelového antigenu vkápli sterilní Pasteurovou pipetou tolik tohoto antigenu, aby barevná skvrna nepřesahovala přes okraj rozpité kapky krevního séra. Potom jsme obdélník filtračního papíru se sérií deseti takto zpracovaných vzorků ponořili až pod úroveň rozpité kapky směsi krevního séra a antigenu do lázně se sterilním fyziologickým roztokem. Když se filtrační papír fyziologickým roztokem napojil, vyjmuli jsme jej z lázně a posoudili jsme výsledek reakce. U každé zásilky vzorků zaječí krve jsme současně dělali pozitivní a negativní kontrolu. Jako pozitivní reakce byla hodnocena sytě růžovočervená ostře ohraničená skvrna na filtračním papíru, jež se vytvořila v důsledku pevné vazby obarvených brucel na aglutinační protilátky přítomné v krevním séru. Jako negativní reakce byla hodnocena zřetelná růžovočervená stopa na filtračním papíru, která vznikla vyplavením volných obarvených brucel při vztlínání fyziologického roztoku.

Abychom potvrdili specifičnost pozitivních reakcí povrchově fixačního testu, podrobili jsme komplexnímu laboratornímu vyšetření na brucelózu 29 ze 33 sérologicky pozitivních zajíců (ve čtyřech případech se nepodařilo zajistit transport z místa honu do ústavu). Všechny zajice jsme pitvali, změněné orgány 19 zajíců byly podrobeny bakteriologickému vyšetření. Ke kultivaci jsme použili Tryptose agar DIFCO. U deseti zajíců doručených do ústavu se značným zpožděním již ve zřetelně narušeném stavu a u čtyř zajíců, u nichž se kultivační záchyt brucel nezdařil, byl proveden biologický pokus na brucelózu.

Jelikož jsme na základě tohoto dvouletého ověřování spolehlivosti povrchově fixačního testu získali ty nejlepší zkušenosti, zavedli jsme tento test na našem pracovišti do sérologické diagnostiky brucelózy zajíců natrvalo. V letech 1975 až 1983 jsme touto metodou spolehlivě vyšetřili dalších 11 246 vzorků, z čehož připadá 9385 vzorků na plošný epizootologický průzkum brucelózy zajíců v celé nasávací oblasti ústavu. Tento průzkum jsme dělali na sklonku roku 1983.

Před rokem 1973 byly na našem pracovišti vzorky zaječí krve vyšetřovány na brucelózu rychlou sklíčkovou aglutinací, a to ze stejných oblastí okresu Olomouc, v nichž byla v letech 1973 a 1974 ověřována spolehlivost povrchově fixačního testu. V letech 1970 až 1972 bylo rychlou sklíčkovou aglutinací vyšetřeno 866 vzorků zaječí krve s mizivým záchytem pozitivních kusů.

I. Přehled výsledků sérologického vyšetření zaječích krví, provedeného v letech 1970 až 1972, 1973 až 1974 a 1975 až 1983 — The results of the serological examination of hare blood performed in the years 1970—1972, 1973—1974 and 1975—1983

V letech	Sérologicky vyšetřeno zaječích krví		Počet pozitivních zajíců	Procento pozitivních nálezů
	počet vzorků	použitá metoda		
1970—1972	866	rychlá skličková aglutinace	2	0,23
1973—1974	961	povrchově fixační test	33	3,43
1975—1983	11 246	povrchově fixační test	150	1,33

VÝSLEDKY

Z 961 vzorku krve zajíců vyšetřených povrchově fixačním testem v průběhu cílené depistáže v letech 1973 a 1974 jsme diagnostikovali 33 pozitivní reagenty. S těmito výsledky nápadně kontrastuje nízký záchyt pozitivních zajíců, jehož bylo dosaženo v téže oblasti v letech 1970 až 1972 při vyšetření 866 vzorků zaječí krve rychlou skličkovou aglutinací (tab. I).

Výsledky komplexního laboratorního vyšetření na brucelózu, k němuž došlo v rámci dvouleté depistáže u 29 sérologicky pozitivních zajíců, lze shrnout takto: u všech 29 vyšetřovaných zajíců byla brucelóza potvrzena patologicko-anatomicky. U samčí zvěře převažovaly brucelózní orchitidy s nálezem uzlovité nebo difúzní formy s charakteristickou koagulační nekrózou parenchymu. Kromě změn na varlatech byly v několika případech zjištěny charakteristické změny na parenchymatózních orgánech, a to většinou ve slezině a na játrech v podobě solitárních uzlů různé velikosti. U samičí zvěře byly zjištěny změny charakteristické pro brucelózu zajíců v děloze, ve slezině, játrech a plicích.

V rámci bakteriologického vyšetření 19 sérologicky pozitivních reagentů byl kultivační záchyt brucel úspěšný u 15 zajíců. Všechny izolované kmeny byly identifikovány jako *Brucella suis*, biovar 2. U zbývajících deseti sérologicky pozitivních zajíců, u nichž bylo bakteriologické vyšetření bezpředmětné (neboť byli do ústavu doručeni opožděně, již v narušeném stavu), a u čtyř zajíců, u nichž se kultivační záchyt brucel nezdařil, byla brucelóza potvrzena biologickým pokusem na morčatech (tab. II).

DISKUSE

Zásluhou pracovníků Státního veterinárního ústavu v Jihlavě (Matoušek a Františková, 1972) byla u nás do diagnostiky brucelózy zajíců zavedena nová sérologická metoda — povrchově fixační test. Výsledky, jichž jsme na našem pracovišti během dvouletého ověřování tohoto testu dosáhli, jsou plně v souladu s poznatky uvedených autorů. Přesvědčivě ukázaly, že povrchově fixační test je metodou výsoce citlivou, poskytující specifické reakce, a tím i spolehlivé výsledky, a že tuto metodu lze bez obtíží zavést do běžné rutinní diagnostické

II. Přehled výsledků komplexního laboratorního vyšetření na brucelózu u 29 zajíců, u nichž byl povrchově fixační test pozitivní — The results of the complex laboratory examination for brucellosis in 29 hares who had positive surface fixation tests

Druh laboratorního vyšetření	Počet vyšetřených zajíců	Brucelóza potvrzena u:	Procento pozitivních nálezů
Pitva	29	29	100
Bakteriologické vyšetření ⁺	19	15	78,95
Biologický pokus ⁺⁺	14	14	100

⁺ — 10 zajíců doručených opožděně v narušeném stavu nebylo bakteriologicky vyšetřeno

⁺⁺ — proveden u deseti bakteriologicky nevyšetřených zajíců a u čtyř zajíců, u nichž se kultivační záchyt brucel nepodařil

praxe. Ověřili jsme si, že spolehlivost výsledků popsaného testu může být ohrožena jediné špatnou kvalitou brucelového antigenu pro rychlou sklíčkovou aglutinaci, vyráběného Biovetou, n. p., Ivanovice na Hané. Kvalita antigenu je závislá na tom, jak pevně je barvivo použité k jeho výrobě fixováno na výrobní kmen brucel. Antigen, u kterého je toto barvivo z bakteriálních buněk vyplavováno do ředidla, je pro povrchově fixační test nepoužitelný.

Tím, že naše diagnostika má k dispozici tuto sérologickou metodu pro rychlou a spolehlivou diagnostiku brucelózy zajíců, byly u nás vytvořeny potřebné předpoklady pro soustavné sledování nálezové situace u zajíců, které je třeba chápat jako nedílnou součást účinné prevence brucelózy prasat. To má velký význam pro spolehlivou ochranu zejména našich velkochovů prasat před zavlečením této nebezpečné nákazy, jejíž likvidace je vždy spojena nejen s enormním pracovním zatížením našich diagnostických pracovišť, nýbrž i se značnými ekonomickými ztrátami.

Povrchově fixační test je již po léta s úspěchem používán v rutinní sérologické diagnostice brucelózy zajíců v mnoha našich diagnostických laboratořích. Vzhledm k jeho vysoké efektivnosti by bylo žádoucí, aby byl zaveden do běžné diagnostické praxe na území celého státu.

Literatura

- DEDEK, J.: Untersuchung zur epizootologischen Bedeutung der Hasenbrucellose. [Abschlussarbeit zum Fachtierarzt für Labordiagnostik.] Berlin 1979. — Humboldt Universität.
- DEDEK, J.: Zur Epizootologie der Schweinebrucellose unter besonderer Berücksichtigung von Erregerreservoirs. Mh. Veter.-Med., 38, 1983, s. 852-856.
- ENGLERT, H. K. — WEIS, J. — OSOLINA, E.: Brucellosis in pigs. Tierärztl. Umsch., 19, 1964, s. 509-511.
- FENSKE, G. — PULST, H.: Die epizootologische Bedeutung der Hasen- und Wildschwein-Brucellose. Mh. Veter. Med., 28, 1973, s. 537-541.
- HANDL, R. — BENEŠ, S.: K problematice diagnostiky brucelózy prasat. Veterinářství, 24, 1974, č. 9, s. 413-414.
- IWANOW, M. M. — TROPILO, J.: Investigations on Brucella bacteria isolated from the hare in Poland. Wed. weter., 22, 1966, s. 82-84.
- KARDEVAN, A. — KEMENES, F.: Brucellosis in hares in Hungary. Magy. állatorv. Lap., 16, 1961, s. 59-61.

LOSINSKI, T. — CHWALIBOG, J. — KEMPSKI, W. — LEWKOWICZ, H. — OWIADUK, Z. — WISNIEWSKI, B.: Badania nad brucelosa zajacy. Med. weter., 28, 1972, s. 331-334.

MATOUŠEK, Z. — FRANTIŠKOVÁ, M.: Povrchově fixační test v rychlé diagnostice brucelózy. Veterinářství, 22, 1972, č. 11, s. 515-516.

WILLINGER, H.: Brucellose bei Feldhasen in Österreich. Wien. tierärztl. Mschr., 47, 1960, s. 661-669.

Došlo dne 19. 7. 1984

ХАНДЛ, Р. (Государственный институт ветеринарии, Оломоуц): Эффективность поверхностного фикс-теста в диагностике бруцеллеза зайцев. Veter. Med., (Praha), 30, 1985 (8) : 501-505.

В течение 2 лет испытывали надежность этого теста на 961 образце заячей крови при отлове на охотничьих участках некоторых мест вокруг Оломоуца. Из 33 позитивных в серологическом отношении зайцев 29 реагентов были исследованы в лабораторных условиях на бруцеллез. Во всех случаях бруцеллез подтвержден в патологоанатомическом порядке, у 78,95 % бактериологически исследованных зайцев в культивационном порядке, а в остальных случаях — биологическим путем на морских свинках. Как подтверждают результаты, поверхностно фиксирующий тест — эффективный метод надежного серологического диагностирования бруцеллеза зайцев.

надежный серологический метод; кровь; комплексное лабораторное исследование

HANDL, R. (State Veterinary Institute, Olomouc): *Effectiveness of Surface Fixation Test in the Diagnostics of Hare Brucellosis*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 501-505.

In the course of two years the reliability of surface fixation test was tested in the diagnostics of hare brucellosis on 961 hare blood samples taken during chases at chosen localities of the Olomouc district. Out of 33 serologically positive hares, 29 reacting ones were subjected to complex laboratory examination for brucellosis. In all cases brucellosis was confirmed patho-anatomically, by cultivation in 78.95 % of bacteriologically examined hares and in the rest cases by bioassay on guinea-pigs. The results have confirmed that the surface fixation test represents a highly effective method for the reliable serological diagnostics of hare brucellosis.

reliable serological method; blood; complex laboratory examination

HANDL, R. (Staatliches veterinärmedizinisches Institut, Olomouc): *Effektivität des Oberflächenfixierungstestes in der Diagnostik der Brucellose der Hasen*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 501-505.

Im Verlauf von zwei Jahren wurde die Verlässlichkeit des Oberflächenfixierungstestes in der Diagnostik der Brucellose der Hasen an 961 Hasenblutproben, die nach Jagden in ausgewählten Lokalitäten des Kreises Olomouc entnommen wurden, geprüft. Von 33 serologisch positiven Hasen wurden 29 Reagierende einer komplexen Laboruntersuchung auf Brucellose unterzogen. Im sämtlichen Fällen wurde die Brucellose pathologisch-anatomisch bestätigt, durch Kultivierung wurde sie bei 78,95 % der bakteriologisch untersuchten Hasen und in den übrigen Fällen durch biologischen Versuch an Meerschweinchen nachgewiesen. Die ermittelten Ergebnisse bestätigen, daß der Oberflächenfixierungstest eine hoch effektive Methode für die verlässliche serologische Diagnostik der Brucellose der Hasen darstellt.

verlässliche serologische Methode; Blut; Laborkomplexuntersuchung

Adresa autora:

MVDr. Roman Handl, Státní veterinární ústav, Jakoubka ze Stříbra 1, 777 00 Olomouc

NEONATÁLNÍ TOXOPLAZMÓZA KOČAT

M. Svoboda, V. Svobodová

SVOBODA, M. — SVOBODOVÁ, V. (Vysoká škola veterinární, Brno): *Neonataální toxoplazmóza koťat*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (8) : 507-512.

V práci se popisuje výskyt toxoplazmózy u kočky-matky a tří koťat. Klinické příznaky byly nevýrazné: zježená srst, konjunktivitida, kýčání a zvětšené mízní uzliny mandibulární a popliteální. Titry protilátek proti *Toxoplasma gondii* byly zjištěny u všech koťat i matky: Sabin-Feldmanova reakce titr 4 — 32, komplementfixační reakce titr 5 — 40. Také mikroprecipitace v agarovém gelu byla u všech zvířat pozitivní. Oocysty *Toxoplasma gondii* vylučovala trusem matka a dvě šestnáctidenní koťata. Izolační pokus na bílých myších s negativním nálezem toxoplazmózy (inokulace vzorků mozku, jater a sleziny) prokázal u všech sledovaných koček toxoplazmózu. Koťata byla s velkou pravděpodobností nakažena transplacentárně.

Toxoplasma gondii; kočka; protilátky; oocysty; transplacentární infekce

Diaplacentární přenos toxoplazmózy (přenos z matky na potomstvo během gravidity) představuje jednu ze tří hlavních cest infekce a má velký význam pro udržování přírodních ohnisek toxoplazmózy (Hejliček aj., 1982; Jíra a Rosický, 1983). Tento způsob infekce se patrně nejčastěji vyskytuje u ovcí (Beverley aj., 1971). Fleck a Kwantes (1980) uvádějí, že 70 % abortů u bahnic souvisí s toxoplazmózou. Experimentálními pokusy s transplacentárním přenosem toxoplazmózy u králíků se zabývali Janitschke a Jörren (1970). Po infekci ramlic v prvních 20 dnech březosti bylo postiženo 51 fětů ze 60. Uhlíková a Hübner (1973) prokázali diaplacentární přenos u 11,5 % králíčích mláďat z devíti vrhů od tří ramlic. Opakovaně jsou popisovány aborty koz způsobené toxoplazmózou. Dubey (1981) uvádí, že pro kozí plod je letálních deset vysporulovaných oocyst *Toxoplasma gondii* (dále jen *T. g.*). Sporadicky je tento způsob infekce zjišťován u telat (Tainturier aj., 1980), prasat (Hansen aj., 1977) a psů (Ehrensperger a Suter, 1977; Nesbit aj., 1981). Pro srovnání dva údaje z humánní medicíny: Terragna (1975) uvádí, že v Evropě představuje kongenitální toxoplazmóza 1 až 6 % nemocí novorozenců. V USA se rodí přibližně jedno dítě z 1000 s kongenitální toxoplazmózou (Frenkel, 1973).

U kočky, která jako definitivní hostitel *T. g.* má v šíření onemocnění zásadní význam, jsou zprávy o transplacentárním přenosu toxoplazmózy zcela ojedinělé. Dubey a Hoover (1977) experimentálně infikovali tkáňovými cystami *T. g.* 16 koček v různém stadiu březosti. Toxoplazmóza se vyskytla pouze v jednom vrhu u tří ze šesti koťat,

kteřá uhynula nebo byla utracena 9., 16. a 22. den po porodu. Diaplastentární přenos infekce nebyl potvrzen. Dubey a Johnstone (1982) popsali případ fatální neonatální toxoplazmózy u tří koťat s těžkými klinickými příznaky (*dyspnoe, conjunctivitis purulenta, ataxie*), u něhož předpokládají transplacentární přenos infekce.

Vzhledem k tomu, že na klinice chorob malých zvířat VŠV uskutečňujeme plošné vyšetření koček zaměřené na výskyt toxoplazmózy, podařilo se nám kombinací vyšetřovacích metod diagnostikovat neobvyklý případ toxoplazmózy kočky-matky a tří 16denních koťat. Popisem tohoto případu s úvahami o způsobu infekce se zabývá naše práce.

MATERIÁL A METODA

V červnu 1983 byla na kliniku chorob malých zvířat přijata na pozorování toulavá kočka neznámého původu, která poranila člověka. Jednalo se o evropskou krátkosrstou kočku domácí ve věku asi dvou let, samičího pohlaví. Kočka byla vysocě březí. Měla zvětšené mandibulární mízní uzliny, parazitární zánět zevního zvukovodu a byla výrazně agresivní. Specifické klinické příznaky onemocnění vzteklinou jsme nezjistili. Pátý den hospitalizace se kočka narodila tři klinicky zdravá koťata. Porod proběhl normálně. Koncem prvního týdne života koťat jsme u všech zvířat ve vrhu pozorovali zjevenou srst, lehkou konjunktivitidu (oční štěrby byly ještě uzavřeny), občasné kýčání a častější nařikání. Za tři až čtyři dny se stav spontánně upravil.

Po uplynutí třítydenní pozorovací lhůty jsme matku i koťata (16 dnů stará) celkově klinicky vyšetřili a odebrali jsme vzorky krve k sérologickému vyšetření. Trus k parazitologickému vyšetření jsme odebrali rektální rourkou podle Schüffnera. Pak jsme zvířata utratili a založili izolační pokus na toxoplazma negativních bílých myších. (Sérologická vyšetření krve a izolační pokusy jsme dělali na katedře epizootologie a mikrobiologie VŠV.) Myším jsme intraperitoneálně aplikovali vzorky mozku, jater a sleziny utracených koček podle metodiky, kterou popisují Hejlicek aj. (1981). Pro každou kočku jsme použili tři myši.

Vzorky trusu jsme zpracovávali za použití flotačního média o specifické hmotnosti 1150 (roztok cukru) a prohlíželi při zvětšení 200 až 400X. Pro posouzení množství vylučovaných oocyst jsme použili hodnocení podle Rašína (1973).

Sérologická vyšetření jsme dělali Sabin-Feldmanovou reakcí (SFR), komplementfixační reakcí (KFR) a mikroprecipitací v agarovém gelu (MPA) podle standardních laboratorních metodik.

VÝSLEDKY

V den odběru vzorků byla koťata v dobrém výživném a zdravotním stavu. Jejich hmotnost se pohybovala od 240 do 260 g. Jediným klinickým příznakem bylo mírné zduření mízních uzlin mandibulárních a popliteálních. Preskapulární mízní uzliny se nepodařilo vypalpat. Klinický nálezn u matky byl stejný jako v den příchodu na kliniku.

Výsledky dalších vyšetření jsou shrnuty v tab. I. Protilátky proti *T. g.* jsme zjistili všemi sérologickými metodami u každé ze čtyř vyšetřených koček. Titry specifických protilátek, prokázané SFR, se pohybovaly od 4 do 32, KFR od 5 do 40 a rovněž MPA byla u všech zvířat pozitivní. Nejvyšší titry jsme zjistili u dospělé kočky.

Nevysporulované oocysty široce oválného tvaru o rozměrech 10 až 12 μm jsme prokázali v trusu dospělé kočky a dvou šestnáctidenních koťat. Kotě č. 2 bylo negativní. Nejméně oocyst vylučovala matka (+), nejvíce kotě č. 3 (+++). Oocysty *T. g.* vysporulovaly při teplotě labora-

Nacionále	Sérologická reakce — titr protilátek			Oocysty <i>T.g.</i> v trusu	Izolační pokus (mozek, játra, slezina)
	SFR	KFR	MPA		
Dospělá kočka	32	40	+	+	++
Kotě č. 1	16	10	+	+	+
Kotě č. 2	4	5	+	—	+
Kotě č. 3	8	10	+	++	+

SFR — Sabin-Feldmanova reakce

KFR — komplementifixační reakce

MPA — mikroprecipitace v agarovém gelu

+ — u dospělých koček pokus založen pouze z jater a sleziny; hlava odeslána k vyšetření na vzteklinu

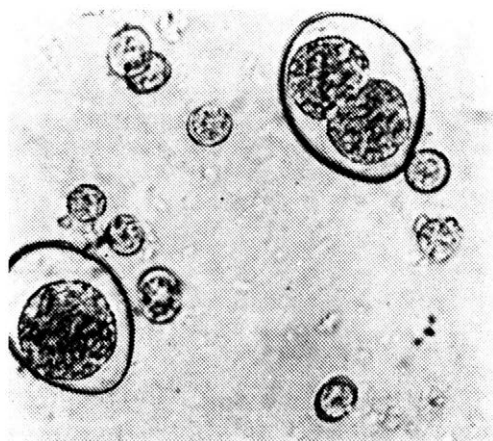
toře během dvou dnů (obr. 1) a od morfologicky téměř shodných oocyst *Hammondia hammondi* jsme je odlišili biologickým pokusem na myších. Ostatní druhy kokcií ani jiné endoparazity jsme nezjistili.

Běžné patologické vyšetření bylo u všech koček negativní. Izolačním pokusem na toxoplazma negativních bílých myších jsme u všech zvířat zjistili ojedinělé tkáňové cysty. Vzhledem k tomu, že myším byl aplikován směsný vzorek orgánů utracených koček (mozek + játra + slezina), nebylo možné odlišit, z kterého orgánu byla *T. g.* izolována.

DISKUSE

Kočky se toxoplazmózou nejčastěji nakazí po pozření tkáňových cyst *T. g.* v syrovém masu (ulovené zvěři). V našem případě tento způsob postnatální infekce nepřichází v úvahu, protože výlučnou potravou koťat bylo mateřské mléko. Tkáňové cysty jsou nejzávažnějším zdrojem infekce u odstavených koťat (věk 2—4 měsíce), která začínou systematicky přijímat syrové maso (F a y e r, 1981).

1. Nevysporulované oocysty *T. gondii* ve srovnání s přidávanými oocystami *Isospora felis* (foto doc. Nevoles) — Oocysts of *Toxoplasma gondii* which did not undergo sporulation in comparison with added oocysts of *Isospora felis* (photo by docent Nevoles)



Další možnou cestou nákazy je perorální infekce vysporulovanými oocystami *T. g.* z trusu matky nebo z prostředí. Ani tento způsob infekce se nezdá být možný, protože prepatentní perioda po pozření oocyst *T. g.* bývá zpravidla delší než tři týdny a s ohledem na patentní periodu, která bývá obvykle jeden až tři týdny (Frenkel, 1982), by těžko mohlo dojít k současnému vylučování oocyst *T. g.* u matky a jejích mláďat, jak tomu bylo v našem případě. Kořata sice žila celé období s matkou, ale byla umístěna v hospitalizační kleci s roštovou podlahou, která byla denně čištěna, dezinfikována a výkaly byly z podroštové části pravidelně odstraňovány. Kromě toho po pozření vysporulovaných oocyst nedochází u infikovaných koček často k vylučování oocyst *T. g.* Frenkel (1982) nacházel oocysty *T. g.* v trusu pouze 16 % koček experimentálně infikovaných vysporulovanými oocystami *T. g.*

Jako třetí možnost postnatální infekce kořat je třeba vzít v úvahu přenos toxoplazmózy mateřským mlékem, slinami, konjunktiválním sekretem ap. od matky, která vylučuje tachyzoity během parazitémie, tj. v akutním stadiu onemocnění. Obecně je tato možnost považována za mimořádně vzácnou. V našem případě ji musíme vzít v úvahu, protože mateřské mléko bylo jediným zdrojem potravy kořat. Ale i tento způsob infekce je málo pravděpodobný s ohledem na prepatentní periodu po infekci tachyzoity (minimálně 14 dnů) a zjištěné titry protilátek (Fayer, 1981).

V našem případě předpokládáme transplacentární způsob infekce kořat. Svědčí pro to tyto údaje:

1. Onemocněla všechna kořata ve vrhu.
2. Za období parazitémie považujeme výskyt všeobecných klinických příznaků (zježená srst, konjunktivitida, kýčání, nářek). Tyto příznaky se objevily již několik dnů po porodu, což je ve shodě s Dubeyem a Johnstonem (1982), kteří zjistili u tří kořat transplacentární způsob infekce.

3. Třemi sérologickými vyšetřovacími metodami (SFR, KFR, MPA) jsme u matky a všech kořat zjistili specifické protilátky. Při postnatální infekci bychom mohli zjistit specifické protilátky prostřednictvím SFR, event. KFR, které zjišťujeme nejdříve devátý, popř. dvanáctý den po nakažení (Koubaj, 1974), ale MPA bývá pozitivní obvykle až za pět týdnů po vniknutí parazita do organismu (Hübner a Uhlíková, 1973).

4. Matka a dvě ze tří kořat vylučovaly oocysty *T. g.*

5. Izolační pokus na toxoplazma negativních bílých myších prokázal toxoplazmózu u všech čtyř sledovaných zvířat. V kompresních preparátech infikovaných myší byly prokázány ojedinělé cysty *T. g.* Patologicky nebyly zjištěny příznaky odpovídající akutnímu průběhu nemoci v období parazitémie. Z toho důvodu předpokládáme, že izolační pokus neprokazoval tachyzoity, ale tkáňové cysty *T. g.* Dubey (1977) uvádí, že tkáňové cysty nejsou obvykle nacházeny dříve než za čtyři týdny po infekci.

Stanovit dobu a způsob infekce matky před porodem není zpětně možné. Navíc se jednalo o kočku toulavou, u níž chybí základní anamnestické údaje. Přesto je jako nejpravděpodobnější předpoklad, že se matka infikovala několik dnů před porodem.

Ve srovnání s ostatními druhy zvířat (ovce, koza, králík, myš ap.)

je transplacentární přenos toxoplazmózy u koček vzácný. Není považován za důležitý faktor sterility a abortů koček a postnatální mortality koťat, ani za důležitý epizootologický faktor pro přetrvávání infekce v populaci koček (Dubey a Hoover, 1977; Frenkel, 1982). Neobvyklý je i případ uvedený v naší práci. Z dosud více než 600 vyšetřených koček je to poprvé, kdy se u koťat mladších než tři týdny podařilo současně prokázat specifické protilátky, oocysty *T. g.*, a kdy byl izolační pokus pozitivní.

Literatura

- BEVERLEY, J. K. A. — ARCHER, J. F. — WATSON, W. A. — FAWCETT, A. R.: Trial of a killed vaccine in the prevention of ovine abortion due to Toxoplasmosis. Brit. veter. J., 127, 1971, č. 11, s. 529-535.
- DUBEY, J. P.: Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis, and other tissue cysts-forming coccidia of man and animals. In: KREIER, J. P. (Ed.): Parasitic Protozoa, vol. 3. New York, Academic Press Inc. 1977, s. 101-237.
- DUBEY, J. P.: Prevention of abortion and neonatal death due to Toxoplasmosis by vaccination of goats with the nonpathogenic coccidium *Hammondia hammondi*. Amer. J. veter. Res., 42, 1981, č. 12, s. 2155-2157.
- DUBEY, J. P. — HOOVER, E. A.: Attempted transmission of *Toxoplasma gondii* infection from pregnant cats to their kittens. J. Amer. veter. med. Assoc., 170, 1977, č. 5, s. 538-540.
- DUBEY, J. P. — JOHNSTONE, I.: Fatal neonatal Toxoplasmosis in cats. J. Amer. anim. Hosp. Assoc., 18, 1982, s. 461-467.
- EHRENSPERGER, F. — SUTER, M.: *Radiculitis toxoplasmica* beim Hund. Kleintierpraxis, 22, 1977, s. 59-62.
- FAYER, R.: Toxoplasmosis update and public health implications. Can. veter. J., 22, 1981, č. 11, s. 344-352.
- FLECK, D. G. — KWANTES, W.: The laboratory diagnosis of toxoplasmosis. London, HM Stationary Office 1980. 20 s.
- FRENKEL, J. K.: Toxoplasma in and around us. Bioscience, 23, 1973, s. 343-352.
- FRENKEL, J. K.: Common questions on toxoplasmosis: Veterinary, medical, and public health considerations. Veter. Med. small anim. Clin., 77, 1982, č. 8, s. 1188-1196.
- HANSEN, H. J. — HULDT, G. — THAFVELIN, B.: On porcine toxoplasmosis in Sweden. Nord. Veter.-Med., 29, 1977, s. 381-385.
- HEJLIČEK, K. — PROŠEK, F. — TREML, F.: Isolation of *Toxoplasma gondii* in free-living small animals and birds. Acta veter. (Brno), 50, 1981, č. 3-4, s. 233-236.
- HEJLIČEK, K. — VRTIAK, J. O. a kol.: Speciální epizootologie 1 — nemoci bakteriální a protozoární. 1. vyd. Praha, Státní zeměd. nakl. 1982. 320 s.
- HÜBNER, J. — UHLÍKOVÁ, M.: Use of microprecipitation method in agar gel (MPA) in the diagnostics of toxoplasmosis 3. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 17, 1973, č. 1, s. 70-84.
- JANITSCHKE, K. — JÖRREN, H. R.: Untersuchungen über die Bedeutung der intrauterinen Übertragung von Toxoplasmen für die Verbreitung der Infektion bei Hauskaninchen. Z. Tropenmed. Parasit., 21, 1970, č. 3, s. 246-251.
- JÍRA, J. — ROSICKÝ, B.: Imunodiagnostika a epidemiologie toxoplazmózy. 1. vyd. Praha, Academia — nakl. ČSAV 1983. 264 s.
- KOUBA, K. — JÍRA, J. — HÜBNER, J.: Toxoplazmóza. 1. vyd. Praha, Avicenum — zdravot. nakl. 1974. 306 s.
- NESBIT, J. W. — LOURENS, D. C. — WILLIAMS, M. C.: Spastic paresis in two littermate pups caused by *Toxoplasma gondii*. J. S. Afr. veter. med. Assoc., 52, 1981, č. 3, s. 243-246.
- RAŠÍN, K.: *Toxoplasma gondii*, *Isospora felis* — přirozená a experimentální infekce koček. Veter. Med. (Praha), 18, 1973, č. 10, s. 593-618.
- TAINTURIER, D. — FRANC, M. — DORCHIES, P. — LAHITTE, J. D.: Toxoplasmose et pathologie de la reproduction chez les ruminants et la truie. Rev. Méd. vét., 131, 1980, č. 3, s. 223-226; 231-235.

TERRAGNA, A.: Present perspectives of toxoplasmosis in pediatrics. *Pediatrician*, 4, 1975, s. 138-154.

UHLÍKOVÁ, M. — HÜBNER, J.: Congenital transmission of *Toxoplasmosis* in domestic rabbits. *Folia Parasit. (Praha)*, 20, 1973, č. 4, s. 285-291.

Došlo dne 25. 11. 1984

СВОБОДА, М. — СВОБОДОВА, В. (Институт ветеринарии, Брно): Неонатальный токсоплазмоз у котят. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985 (8): 507-512.

В работе описаны случаи токсоплазмоза у кошки-матери и 3 котят. Клинические признаки были неотчетливые: взъерошенная шерсть, конъюнктивит, кихание и увеличение лимф в мандибулярной и попliteальной частях. Титры антител против *Toxoplasma gondii* установлены у всех этих животных: Сабин-Фельдманова реакция титр 4 — 32, комплемент-фиксационная реакция титр 5 — 40. Также микропреципитация в агаровом геле у всех животных была положительной. Ооцисты *T. gondii* выделялись в экскрементах матери и двух 16-дневных котят. Изоляционный опыт на белых мышках с негативным диагнозом токсоплазмоза (инокулировка образцов мозга, печени и селезенки) показал у всех кошек токсоплазмоз. Со всей вероятностью, котята были заражены трансплацентарным путем.

Toxoplasma gondii; кошка; антитела; ооцисты; трансплацентное заражение

SVOBODA, M. — SVOBODOVÁ, V. (University of Veterinary Medicine, Brno): Neonatal Toxoplasmosis of Kittens. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985 (8): 507-512.

The occurrence of toxoplasmosis is described in the cat-mother and three kittens. Clinical symptoms were not significant: bristled hair, conjunctivitis, sneezing and hypertrophy of mandibular and popliteal lymph nodes. The titres of antibodies to *Toxoplasma gondii* were demonstrated in all kittens and also in the cat: Sabin-Feldman reaction titre 4 — 32, complement-fixing reaction titre 5 — 40. Micro-precipitation in agar gel was positive in all animals. Oocysts of *Toxoplasma gondii* were eliminated through faeces by the cat and two 16-day-old kittens. An isolation trial on white mice with a negative finding of toxoplasmosis (inoculation of brain, liver and spleen samples) has demonstrated toxoplasmosis in all animals under study. Most probably the kittens were infected transplacentally.

Toxoplasma gondii; cat; antibodies; oocysts; transplacental infection

SVOBODA, M. — SVOBODOVÁ, V. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): Neonatale Toxoplasmose bei Kätzchen. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985 (8): 507-512.

In der Arbeit wird das Vorkommen von Toxoplasmose bei einer Katzenmutter und drei Jungen beschrieben. Die klinischen Symptome waren nur schwach ausgeprägt: gesträubtes Fell, Konjunktivitis, Niesen und Vergrößerungen der Mandibular- und Popliteallymphknoten. Die Titer der Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* wurden sowohl bei allen drei Jungen als auch bei der Mutter festgestellt: Sabin-Feldmann-Reaktion Titer 4 — 32, Komplementbindungsreaktion Titer 5 — 40. Auch die Mikropräzipitation in Agar-Gel war bei allen Tieren positiv. Oozysten der *Toxoplasma gondii* wurden von der Mutter und von zwei sechzehntägigen Kätzchen im Kot abgesetzt. Ein Isolierungsversuch an weißen Mäusen mit negativem Toxoplasmosebefund (Inokulation von Hirn-, Leber- und Milzproben) wies bei den untersuchten Katzen insgesamt die Toxoplasmose nach. Die Katzenjungen wurden höchstwahrscheinlich transplazentär angesteckt.

Toxoplasma gondii; Katze; Antikörper; Oozysten; transplazentare Infektion

Adresa autorů:

MVDr. Miroslav Svoboda, MVDr. Vlasta Svobodová, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

OBSAH

Granátová M., Kozáková A.: Průkaz cytotoxických protilátek v séru leukózního skotu	449
Marek J., Meisl J.: Diagnostika osteopatií u skotu metodou kostní biopsie	457
Šedinová V., Urbanová E., Škarda J., Jukl A.: Stanovení počtu somatických buněk v mléce rychlou difenylamin DNA filtr metodou	467
Skalka B.: Aktualizované schéma pro diagnostiku stafylokoků	477
Pástorová B., Arendarčík J., Molnárová M.: Hladiny katecholových aminů v hypothalamu, hypofýze a v nadobličkách oviec po celotelovej expozícii gama-žiarenia	485
Štill J., Konrád J.: Využití akupunktury k resuscitaci zvířat	493
Handl R.: Efektivnost povrchové fixačního testu v diagnostice brucelózy zajíců	501
Svoboda M., Svobodová V.: Neonatální toxoplazmóza kofat	507

СОДЕРЖАНИЕ

Гранатова М., Козакова А.: Доказательство наличия цитотоксических антител в сыворотке лейкозного крупного рогатого скота	449
Мареk Я., Майсл Й.: Диагностики остеопатии у крупного рогатого скота с помощью костной биопсии	457
Шединова В., Урбанова Э., Шкарда Й., Юкл А.: Определение количества соматематических клеток в молоке по скоростному методу дифиниламин ДНА-фильтр	467
Скалка Б.: Актуализированная схема для диагностики стафилококков	477
Пасторова Б., Арендарчик Й., Молнарова М.: Уровни катехоловых аминов в гипоталамусе, гипофизе и надпочечниках овец после сплошного облучения гамма-лучами	485
Штиль Я., Конрад Я.: Акупунктура в реанимации животных	493
Хандл Р.: Эффективности поверхностного фикса-теста в диагностике бруцеллеза зайцев	501
Свобода М., Свободова В.: Неонатальный токсоплазмоз у котят	507

CONTENTS

Granátová M., Kozáková A.: Demonstration of Cytotoxic Antibodies in the Serum of Cattle Suffering from Leukosis	449
Marek J., Meisl J.: Diagnostics of Osteopathies in Cattle by the Method of Bone Biopsy	457
Šedinová V., Urbanová E., Škarda J., Jukl A.: The Determination of the Counts of Somatic Cells in Milk by the Rapid Diphenylamine DNA Filter Method	467
Škalka B.: An Up-dated Scheme for the Diagnostics of Staphylococci	477
Pástorová B., Arendarčík J., Molnárová M.: Levels of Catecholamines in Hypothalamus, Hypophysis and Adrenal Glands of Sheep after All-Body Exposition to Gamma-Radiation	485
Štill J., Konrád J.: The Use of Acupuncture for Resuscitation of Animals	493
Handl R.: Effectiveness of Surface Fixation Test in the Diagnostics of Hare Brucellosis	501
Svoboda M., Svobodová V.: Neonatal Toxoplasmosis of Kittens	507

INHALT

Granátová M., Kozáková A.: Nachweis zytotoxischer Antikörper im Serum leukosekranker Rinder	449
Marek J., Meisl J.: Diagnostik der Osteopathien beim Rind mittels Knochenbiopsie	457
Šedinová V., Urbanová E., Škarda J., Jukl A.: Bestimmung der Zahl somatischer Zellen in der Milch mittels schneller Diphenylamin-DNA-Filter-Methode	467
Skalka B.: Aktualisiertes Schema der Diagnostik von Staphylokokken	477
Pástorová B., Arendarčík J., Molnárová M.: Katecholaminspiegel im Hypothalamus, in the Hypophyse und in den Nebennieren von Schafen nach gesamtkörperlicher Exposition der Gamma-Strahlung	485
Štill J., Konrád J.: Einsatz der Akupunktur zur Wiederbelebung von Tieren	493
Handl R.: Effektivität des Oberflächenfixierungstestes in der Diagnostik der Brucellose der Hasen	501
Svoboda M., Svobodová V.: Neonatale Toxoplasmose bei Kätzchen	507

Rukopisy odevzdány k tisku 4. 5. 1985 — Podepsáno k tisku 5. 7. 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 MİR, novinářské závody, n. p., závod 6, tř. Lidových milicí 22, 120 00 Praha 2.