

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

10

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

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Řídí redakční rada:

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

Za vedení časopisu odpovídá akademik Otto Jaroslav Vrtiak

Redaktorka ing. Jovanka Václavíčková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství,
Praha 1985

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

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

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

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

VYUŽITÍ RYCHLÉHO ZPŮSOBU KRYOKONZERVACE EMBRYÍ SKOTU PŘI NEKRVAVÉM PŘENOSU V TRANSPLANTAČNÍ PRAXI

L. Holý, A. Jiříček, M. Žák, M. Čapeková, V. Dvořáková, M. Lopatářová

HOLÝ, L. — JIŘÍČEK, A. — ŽÁK, M. — ČAPEKOVÁ, M. — DVOŘÁKOVÁ, V. — LOPATÁŘOVÁ, M. (Vysoká škola veterinární, Brno; JZD Slušovice): *Využití rychlého způsobu kryokonzervace embryí skotu při nekrvavém přenosu v transplantační praxi*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 577-584.

Embrya byla zmrazována a rozmrazována v Cassouově minipejetě rychlou metodou. Embrya s kryoprotektivem (glycerol, 1,5 M) byla vložena přímo do mrazicího média o teplotě -6 až -7°C , po seedingu byla zmrazována při rychlosti poklesu teploty $0,3$ až $0,5^{\circ}\text{C}$ za minutu do teploty -32°C a potom byla přenesena přímo do tekutého dusíku. Rozmrazována byla v lázni 20 až 37°C teplé. Po rozmrazení bylo kryoprotektivum evakuováno v prostředí $1,1$ M sacharózy. Ke zmrazování byla vybírána embrya nejlepších kvalit. Z nich bylo dosud rozmrazeno 366 s průměrnou přežitelností $74,31\%$. Ipsilaterálně bylo přeneseno celkem 268 rozmrazených embryí nechirurgickou cestou 190 vyhodnoceným synchronizovaným jalovicím, z nichž 105 příjemkyň ($55,26\%$) zabřezlo. Rychlá metoda zmrazování na bázi $1,5$ M glycerolu a rozmrazování za přítomnosti $1,1$ M sacharózy se ukázala jako efektivní a pro praxi vhodná, protože zaručuje nejen dostatečnou reviviscenci embryí a jejich přežívání v děloze, ale i podstatné zkrácení doby zmrazovacího i rozmrazovacího procesu.

transfer; ekvilibrace; zmrazování; rozmrazování; seeding

Zmrazování embryí skotu ve stadiu moruly až blastocysty, jež představují útvary o 60 až 150 a více buňkách s diferencujícím se zárodečným terčíkem a trofoblastem, vyžaduje mnohá opatření, která po rozmrazení umožňují nejen obnovu základních celulárních funkcí, ale i další vývoj jedince.

Obnova životnosti embrya u skotu po hlubokém zmrazení není možná bez přidání kryoprotektivních látek (DMSO, Glycerol, Propanediol), které po proniknutí do nitra buněk vyvolávají jejich částečnou dehydrataci a omezují jak intracelulární tvorbu ledových krystalů, tak i narušení buněčných struktur a membrán (Wilmot, 1972; Leibo aj., 1974, 1978; Leibo a Mazur, 1978; Troutson aj., 1978; Renard, 1982; Fulka aj., 1982; Niemann aj., 1982; Leibo, 1984; Hahn, 1984a, b a další).

V poslední době byla na základě přesných pozorování (Whittingham, 1975; Mazur aj., 1976; Leibo a Mazur, 1978; Schneider a Mazur, 1984; Leibo, 1984; Bielanski aj., 1984 a další) učiněna řada kvalitativních změn, které povznesly zmrazování embryí na vědeckou bázi a vedly k jeho podstatnému zkrácení a zjednodušení.

Významnou skutečností bylo poznání, že embrya snášejí bez vážnějšího poškození přímý kontakt s vysoce koncentrovaným kryoprotektivem i rychlé zchlazení na seedingovou teplotu -6 až -7 °C. Převratný byl také poznatek, že k odstranění kryoprotektiva z buňky je nutná existence nepermeabilní složky v médiu, jako je např. sacharóza (sucróza), která tím, že udržuje osmolalitu prostředí v konstantních dimenzích, podmiňuje pomalý odchod kryoprotektiva a zabraňuje náhlé a škodlivé rehydrataci. Není-li nepermeabilní složka v médiu po rozmrazení přítomna, probíhá rehydratace rychleji než odchod kryoprotektiva, buňky bobtnají, poškozuji se jejich struktury a membrány (Leibo a Mazur, 1978; Liehman a Fulka, 1982; Renard aj., 1983; Leibo, 1984 a další) se ztrátou životnosti.

Ve snaze zjednodušit zmrazovací proces s vyloučením laboratorní kontroly embrya po rozmrazení byla v posledních letech vyvinuta tzv. „one-step“ metoda. Tato metoda zjednodušuje zmrazovací i rozmrazovací proces tím, že oba procesy probíhají odděleně v jedné konzervační pejetě, která chová jak embryo s kryoprotektivem, tak i nepermeabilní médium nutné k evakuaci kryoprotektiva (Leibo, 1982; Renard, 1982; Chupin aj., 1983, 1984; Görlach aj., 1983, 1984; Hahn, 1984a, b), s nímž se embryo dostává do styku po rozmrazení.

Cílem této práce bylo prověřit uvedené nové poznatky v kryobiologii embryí a zavést rychlou metodu zmrazování v modifikované podobě do praktické činnosti v rámci transferu embryí v JZD Slušovice.

MATERIÁL A METODY

Embrya byla získávána od krav, méně od jalovic (asi v 27 % případů), zařazených do programu transferu embryí po superovulační stimulaci dárkyň FSH-P (Follikotropin, Léčiva, Praha) v celkové dávce 52 mg v průběhu čtyř dní. Luteolýza byla vyvolána aplikací 500 μ g Oestrophanu spolu s pátou a šestou injekcí FSH. Odběr embryí gravitační metodou připadal v průběhu na sedmý den cyklu.

Pokusy probíhaly od dubna do prosince roku 1984 a ke zmrazování byla vybírána embrya nejlepších kvalit, převážně kompaktní moruly a rané blastocysty.

Při zmrazování, které probíhalo v alkoholovém mrazicím médiu v chladicím aparátě Kryostat (DDR), jsme zachovávali tento postup:

Vybraná embrya byla při pokojové teplotě přenesena do média obsahujícího 1,5 M glycerolu v PBS + 10–20 % FCS (Bofes) a ihned nasáta do Cassouovy mikropejety tak, aby embryo bylo uloženo v centrálním sloupci (délka asi 2–3 cm), který byl z každé strany ohraničen kratším sloupcem vzduchu a krátkým sloupcem kryoprotektiva. Mikropejeta se uzavírala buď zatavením, nebo za pomoci polyvinylového prášku na jedné straně a speciální zátky na straně druhé. Po krátké ekvilibraci (5–10 minut), nutné k proniknutí glycerolu do embryonálních buněk, se pejeta vložila přímo do vychlazeného mrazicího média o teplotě -6 až -7 °C, kde se vzorky podrobily další ekvilibraci po dobu 5 až 10 minut. Po zahájení seedingu dotykem pejety podchlazenou pinzetou nebo tyčinkou (v tekutém dusíku) v místě horního krátkého sloupce média následuje pomalé zchlazování o 0,3 až 0,5 °C za minutu až do teploty -32 °C. Při této teplotě se vzorky udržují po několik minut a potom se rychle přenesou přímo do tekutého dusíku (plung). Další manipulace s mikropejetami probíhá výhradně pod hladinou tekutého dusíku a do konzervačního kontejneru se vzorky přenášejí vždy jen při dostatečném krytí kapalným dusíkem.

Při rozmrazování jsme postupovali tak, že jsme pejety vložili přímo do lázně o teplotě 20 až 30 °C. Bezprostředně po jejich rozmrazení a po evakuaci jejich obsahu jsme embrya přenesli do roztoku sacharózy 1,1 M rozpustěné v PBS, rovněž s přídavkem 10 až 20 % FCS. Po deseti minutách jsme embrya přesadili do čistého PBS s přídavkem 10 až 20 % FCS, kde se rehydratace ukončila.

V této fázi jsme hodnotili stav embryí. Embrya vhodná pro přenos byla přenesena ihned, pochybná pak byla podrobena krátkodobé kultivaci.

I. Zabřezávání příjemkyň po nekrvavém přenosu zmrazených embryí, rozmrazených v roztoku sacharózy — Conception of cows after the non-surgical transfer of frozen embryos, thawed in sucrose solution

Měsíc	Počet zmrazených embryí	Počet rozmrazených embryí	Počet vhodných po rozmrazení	Procento vhodných embryí po rozmrazení	Počet přenesených	Počet zabřezlých příjemkyň	Procento
1.	0	0	0	0	0	0	0
2.	0	0	0	0	0	0	0
3.	0	0	0	0	0	0	0
4.	62	20	16	80,0	12	5	41,66
5.	89	25	21	84,0	21	12	57,14
6.	31	10	8	80,0	8	7	87,50
7.	62	42	32	76,2	32	21	65,62
8.	112	50	43	86,0	43	21	48,84
9.	85	36	32	88,9	32	18	56,25
10.	132	86	42	48,8	42	21	50,00
11.	283	71	60	84,5	(60)	0++	0++
12.	312	26	18	0	(18)	0++	0++
Celkem	1168	366	272	74,3	(268) 190+	105	55,30

+ Dosud vyhodnocena březost u 190 příjemců

++ Březost dosud pro krátkost času nezjišťována

K přenosu byla vždy použita jen taková embrya, která celý zmrazovací proces přežila bez závažnějších morfologických změn a u kterých se projevovaly evidentní známky reviviscence.

Přenos těchto embryí byl uskutečňován zásadně nekrvavou cestou za epidurální anestézie a za pomoci instrumentaria podle Hahna nebo podle Holého. Jako příjemci sloužily výhradně jalovice se synchronizovanou říjí na ± 1 den s dárce. Výsledek přežívání byl pak zjišťován klinickým vyšetřením za pět až šest týdnů po přenosu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Od dubna do prosince roku 1984 bylo celkem zmrazeno 1168 embryí, která byla morfologicky zařazena do kategorie embryí s nejlepší kvalitou. Zvyšující se trend zmrazování v druhé polovině sledovaného roku (tab. I) byl vyvolán snahou o rychlé vytvoření embryonální banky, která by, mimo jiné, umožnila realizaci transferu embryí nezávisle na jejich odběru.

Ve stejném období bylo rozmrazeno (tab. I) celkem 366 embryí, z nichž 272 (tj. 74,31 %) zmrazování přežilo a z nichž převážná většina byla vhodná k dalšímu použití. Z celkového počtu rozmrazených bylo přeneseno 268 embryí do ipsilaterálního rohu příjemkyň, z nichž byla později vyhodnocena březost u 190 zvířat. Z daného souboru koncipovalo celkem 105 jalovic, tj. v průměru 55,26 %. Jak je patrné z tab. I,

výsledky vykazovaly v jednotlivých měsících značnou variabilitu. Kolísaly mezi 41,0 až 87,5 % a mezi nejhorším a nejlepším zabřezáváním v měsíci dubnu a červenci byly rozdíly 46,5 %. Příčiny těchto rozdílů lze dosud těžko postřehnout a mohou se na nich zúčastňovat různé faktory, jako je stupeň synchronizace, kvalita říje, kvalita a funkce žlutého tělíska, individualita a rutina přenášejícího, úroveň výživy, resp. metabolismu atd.

Potěšitelné však je, že po přenosech zmrazených embryí bylo dosaženo ve stejných podmínkách a ve stejném období lepších výsledků než po přenosu embryí čerstvých. Vznikl rozdíl 15,19 % ve prospěch přenosu embryí mražených, protože z 1351 přeneseného čerstvého embrya vzniklo 486 březostí, tj. 40,01 %. (Holý a Jiříček, 1985).

Lepší koncepce po přenosu rozmrazených embryí je nepochybně důsledkem jejich přísnější selekce před zmrazením a po něm a potvrzuje známou skutečnost, že čím kvalitnější embrya zmrazujeme, tím je vyšší jejich přežitelnost *in vitro* (Willadsen, 1980; Lehn-Jensen a Greve, 1981) nebo *in vivo*.

Renard aj. (1983) tak získali po zmrazení vynikajících embryí 80% reviviscenci, která poklesla u embryí s jistými anomáliemi na 50 % a u retardovaných embryí na 26 %. Podobné výsledky potvrdili i Niemann aj. (1982a, b, 1983).

S přežitelností embryí *in vitro* souvisí i přežívání *in vivo*, tedy úroveň koncepce (Pivko aj., 1981; Elsdén, 1982; Elsdén aj., 1982a, b). Hahn (1984b) zaznamenal po nekrvavém přenosu embryí velmi dobrou kvalitu zabřezávání (kolem 50 %), embrya horší kvality přežívala v děloze v 29,6 % a špatná asi ve 20 %. Niemann aj. (1983) dosáhli po transferu velmi dobrých embryí koncepce ve 41,7 % a po přenosu dobrých embryí jen v 15 %. Po přenosu rozmrazených pozdních morul však došlo ke koncepci v 52,9 %. Elsdén (1982) počítá po praktickém transferu rozmrazených embryí s průměrnou koncepcí okolo 40 %; předpokládá však, že je možné ji při dobré selekci embryí zvýšit až na 60 %. Renard aj. (1983) referují o 46% koncepci při rutinním přenosu rozmrazených embryí a uvádějí, že je možné ji zvýšit použitím kvalitních embryí až na 70 %. Chupin aj. (1983) dosáhli po rychlém zmrazování zabřezávání v 54,8 % případů.

Jak se zlepšuje koncepce po přenosu vynikajících rozmrazených embryí, zlepšuje se i zabřezávání po přenosu kvalitních embryí čerstvých (Curtis aj., 1981; Elsdén, 1980, 1982; Donaldson, 1982; Baker a Kobayashi, 1982; Jondet aj., 1982; Kennedy aj., 1983 a další). K dalšímu zlepšení koncepce po přenosu čerstvých embryí v našich podmínkách bude nutné buď zpřesnit kritéria výběru, nebo diferencovat životnost embryí jejich krátkodobou kultivací. U méně kvalitních embryí, ať již čerstvých nebo po rozmrazení, je totiž velmi obtížné rozhodnout o jejich vitalitě, protože v mnoha případech i embrya horších kvalit pokračují ve vývoji a embrya velmi dobrá někdy zacházejí. O dalším vývoji morfologicky méně kvalitních embryí rozhoduje totiž biologická aktivita zbývajících blastomer, takže se nezdědka vyvíjejí i jedinci se značným úbytkem buněk. I po mikrochirurgickém zákroku při dělení embryí, kdy se do jednoty zárodku zasahuje způsobem značně traumatizujícím a kdy se počet buněk moruly nebo rané blastocysty redukuje zhruba na polovinu, se vyvíjí více než polovina těchto poloembryí. Má-

me-li tedy k dispozici dostatečný počet příjemkyň, je možné v případě vynikajícího genofondu embryí použít i jedince horších morfologických kvalit, protože i z nich lze získat jisté, byť i více nebo méně redukované množství telat.

Z tab. I je patrné, že procento vhodných embryí po rozmrazení mělo v některých měsících klesající tendenci (červenec a říjen), což pravděpodobně souvisí se zaškolováním nových pracovníků, kteří byli do procesu zmrazování v těchto obdobích začleňováni.

Pokud jde o variabilitu koncepce po přenosu zmrazených embryí, nejlepšího zabřezávání bylo dosaženo v květnu až červenci (57,14; 87,50; 65,62 %). Je to poměrně shodné s nekrvavými přenosy čerstvých embryí, při nichž byly výsledky zabřezávání nejlepší v červnu, červenci a srpnu (74,1; 51,0 a 56 %). Příčiny variability koncepce lze velmi těžce odhalit. Kromě jiného se na ní mohla podílet i úroveň profesionálního provedení transferu. Podle Elsdena [1982], Donaldsona [1982], Sheaja [1984], Leiba [1984] a dalších se mezi přenášejícími projevily značné rozdíly.

Přežívání rozmrazených embryí ovlivňuje také kvalita říje příjemce. Görlach aj. [1984] uvádějí, že po velmi kvalitní říji zabřezlo 53 % příjemkyň, zatímco po špatné říji přežívala embrya jen u 27 % embryonovaných zvířat.

Výsledky přežitelnosti embryí po rychlém zmrazení a po rozmrazení, za přítomnosti nepermeabilního roztoku sacharózy (1,1 M), popsané v této práci, ukazují, že si embrya zachovávají nejen vysokou úroveň přežitelnosti *in vitro* (74,31 %), ale i vysokou schopnost dalšího vývoje v děloze (55,26 %). Předkládané výsledky jsou srovnatelné s údaji současných zahraničních autorů a svědčí o vhodnosti použité kryo-biologické metody v praxi.

Nížší koncepce po použití originální metody „one-step“ (Renard aj., 1982a, b; Leibo, 1982a, b; 1984; Görlach aj., 1984) je asi důsledkem absence kontroly embrya po rozmrazení, protože v určitém počtu případů se musí nutně přenášet embryo neživé, resp. s minimální životností. Proto jsme v současné době dali přednost popsané rychlé metodě zmrazování s možností kontroly embrya po zmrazení.

Literatura

- BAKER, A. A. — KOBAYASHI, G.: A comparison of the pregnancy rate following nonsurgical and surgical transfer and visual grading of bovine embryos on a farm in south-eastern Queensland. In: 2. Congr. int. Transf. d'embr. chez les mammifères, Annecy 1982, s. 311.
- BIELANSKI, A. — JOHNSON, W. — SCHNEIDER, U. — MAPLETOFT, R. J.: Plunge temperatures and embryo survival. *Theriogenology*, 21, 1984, č. 1, s. 221.
- CURTIS, J. E. — ELSDEN, P. — SEIDEL, G. E.: Nonsurgical transfer of bovine embryos. *Theriogenology*, 1981, s. 124.
- DONALDSON, L. E.: Embryo transfer in cattle. *Rio Vista Int.*, San Antonio 1982, s. 54-90.
- EISDEN, P. R.: Bovine embryo transfer. *Soc. Theriogenol. Proc. ann. Meet. Nebraska* 1980.
- ELSDEN, P. R.: Recent advances in bovine embryo transfer. *Proc. techn. Conf. A. I. Reprod. Wisconsin* 1982.
- ELSDEN, R. P. — SEIDEL, G. E. — TAKEDA, T. — FARRAND, G. D.: Frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. *Theriogenology*, 17, 1982, s. 1-10.

- ELSDEN, R. P. — SEIDEL, G. E. — TAKEDA, T. — FARRAND, G. D.: Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. *Theriogenology*, 17, 1982, s. 1-10.
- FULKA, J. — PAVLOK, A. — MOTLÍK, J.: Přenos embryí u skotu. *Náš chov*, 7, 1982, s. 280-283.
- GÖRLACH, A. — HAHN, R. — HAHN, J.: Vergleichende Untersuchungen zur Superovulation beim Rind mit Gonadotropinen und Ergebnisse mit dem Transfer geteilter Embryonen. Deutsch-sowjetisches Symposium über Mikromanipulation und Embryotransfer beim Rind. Dubrovici bei Moskau 1984.
- GÖRLACH, A. — HAHN, R. — HAHN, J. — KÜSTER, S.: Untersuchungsergebnisse bei verschiedenen Verfahren der Tiergefrierkonservierung von Rinderembryonen. In: Fortschritte der Fertilisationsforschung FDF 12 (Kongressbericht), Rothenburg 1983, s. 618-621.
- HAHN, J.: Entwicklungstendenzen beim Embryotransfer. Deutsch-sowjetisches Symposium über Mikromanipulation und Embryotransfer beim Rind. Dubrovici bei Moskau 1984a.
- HAHN, J.: Vývoj transplantace raných embryí v NSR. Řízená reprodukce a plemennářské využití přenosu raných embryí. In: Sbor celost. Konf. Slušovice 1984b, s. 45-51.
- HEYMEN, J.: La congelation d'embryons: un atout pour le developpment des transplantations. *Bull. techn. de I. A.*, 1983, č. 29, s. 15-20.
- HOLY, J. — JIŘÍČEK, A.: Výsledky transferu embryí v podmínkách velkochovu skotu. In: Sbor. ref. ze IV. Reprod. dnů. Praha, VŠZ 1985.
- CHUPIN, D. — FLORIN, B. — PROCUREUR, R.: Comparaison en ferme de l'efficacité de différentes méthodes de congelation. Décongelation du blastocyste bovin conditionné en palette. *Bull. techn. I. A.*, Août-Sept., 1983, s. 21-22.
- CHUPIN, D. — FLORIN, B. — PROCUREUR, R.: Comparison of two methods for one-step in straw thawing and direct transfer of cattle blastocysts. *Theriogenology*, 21, 1984, s. 445-460.
- JONDET, R. — VINCENT, F. — RABADEUX, Y. — LE GUILLOUX, Y.: Nonsurgical collection and transfer of bovine embryos in Britany. In: 2. Cong. int. Transf. d'embr. chez les mammifères, Annecy 1982, s. 331.
- KENNEDY, L. G. — BOLAND, M. P. — GORDON, I.: Effect of bovine embryo quality on survival after rapid freezing and thawing. *Theriogenology*, 19, 1983, s. 135.
- LEHN-JENSEN, H. — GREVE, T.: Survival of cow blastocysts utilizing short freezing curves. *Nord. Veter-Med.*, 33, 1981, s. 523-529.
- LEIBO, S. P.: A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Proc. 2nd int. Congr. Embryo transfer in mammalia*. Annecy 1982a.
- LEIBO, S. P.: Embryo transfer in cattle. *Rio Vista Int.*, San Antonio 1982b, s. 32-53.
- LEIBO, S. P.: A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21, 1984, č. 5, s. 767-790.
- LEIBO, S. P. — MAZUR, P.: Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: DANIEL, J. C.: *Methods in mammalian reproduction*. New York, Academic Press 1978, s. 179-201.
- LEIBO, S. P. — MAZUR, P. — JACKOWSKI, S. C.: Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp. Cell. Res.*, 89, 1974, s. 79-88.
- LEIBO, S. P. — Mc GRATH, J. J. — GRAVALHO, E. G.: Microscopic observations of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology*, 15, 1978, s. 257-271.
- LEIBO, S. P. — WEST, A. W. — PERRY, B.: A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed embryos. I. Basic studies. *Cryobiology*, 19, 1982, s. 673.
- LIEHMAN, P. — FULKA, J.: Konzervace embryí u skotu velmi nízkými teplotami. XI. Genetické dny Hradec Králové, 21-22. 9. 1982.
- MAZUR, P. — RIGOPOULOS, N. — JACKOWSKI, S. C. — LEIBO, S. P.: Preliminary estimates of the permeability of mouse ova and early embryos to glycerol. *Biophys. J.*, 16, 1976, s. 232.
- NIEMANN, H. — SACHER, B. — SCHILLING, E. — SCHMIDT, D.: Qualität und Überlebensraten von Rinderembryonen nach schnellen Tiefgefrieren und Auftauen. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, 95, 1982a, s. 415-419.
- NIEMANN, H. — SCHILLING, E. — SACHER, B. — SCHMIDT, A.: Effect of bovine embryo quality on survival rate after freezing and thawing. In: 2. Congr. int. Transf. d'embr. chez les mammifères, Annecy 1982b, s. 313.
- NIEMANN, H. — SACHER, B. — SCHILLING, E.: Einfluß von Qualität und Entwicklungsstadium auf die Überlebensrats tiefgefrorener Rinderembryonen. In: Rot-

henburg Fortschritte der Fertilitätsforschung FDF 12 Kongressbericht, 1983, s. 614-617.
PIVKO, J. — MAJERČIAK, P. — TOMÁNEK, M. — GRAFENAU, P. — VANCISIN, J.: Prenos embrií hovädzieho dobytku a vyššia reprodukcia. Košice, II. časť, 1981, s. 125.

RENARD, J. P.: La conservation des embryons chez les mammifères. In: 2. Congr. int. Transf. d'embr. chez les mammifères. Annecy 1982, s. 285-306.

RENARD, J. P. — HEYMEN, Y. — OZIL, J. P.: Congélation de l'embryon bovin: une nouvelle méthode de décongélation pour le transfert cervical d'embryons conditionnés une seule fois en paillettes. Ann. Méd. vét., 126, 1982a, s. 25-32.

RENARD, J. P. — MENERO, Y. — THERON, M. C.: Effect of lipid supplement on the viability of D7-D8 bovine blastocysts after freezing and thawing. In: 2. Congr. int. Transf. d'embr. chez les mammifères. Annecy 1982b, s. 66-67.

RENARD, J. P. — HEYMEN, Y. — LEYMONIE, P. — PLAT, J. C.: Sucrose dilution: a technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. Theriogenology, 19, 1983, s. 1945.

SCHNEIDER, U. — MAZUR, P.: Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. Theriogenology, 21, 1984, s. 68-79.

SHEA, B. F. — JANZEN, R. E. — DERMAND, D. P.: Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedure in Alberta over a nine-year period. Theriogenology, 21, 1984, s. 186-195.

TROUTSON, A. O. — BRAND, A. — AARTS, M. H.: Nonsurgical transfer of deep frozen bovine embryos. Theriogenology, 1978, s. 111-115.

WHITTINGHAM, D. G.: Survival of rat embryos after freezing and thawing. J. Reprod. Fertil., 43, 1975, s. 575-578.

WILLADSEN, S. M.: Deep freezing of embryos in the large domestic species. Proc. 9th int. Congr. anim. Reprod. A. I., 2, 1980, s. 255-261.

WILMUT, I.: The effect of cooling rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Sci., 11, 1972, s. 1071-1079.

Došlo dne 31. 1. 1985

ГОЛЫ, Л. — ЙИРЖИЧЕК, А. — ЖАК, М. — ЧАПЕКОВА, М. — ДВОРЖАКОВА, В. — ЛОПАТАРЖОВА, М. (Институт ветеринарии, Брно; ЕСХК Слушovice): **Применение скоростного способа криоконсервирования эмбрионов крупного рогатого скота при бескровной пересадке в практике трансплантации.** Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 577-584.

Эмбрионы обрабатывали и размораживали в минипипете скоростным методом. Эмбрионы с криопротективом (глицерин 1,5 М) вкладывали в морозильную среду при -6 до -7°C , а после сидинга замораживали при скорости понижения температуры $0,3-0,5^{\circ}\text{C}$ в минуту до -32°C , после чего помещали прямо в жидкий азот. Размораживали в водяной бане при $20-37^{\circ}\text{C}$, после чего криопротектив переносили в среду с 1,1 М сахарозы. Для размораживали отбирали эмбрионы лучших качеств. Из них пока разморожены 366 со средней выживаемостью 74,31%. В ипсилатеральном порядке пересаживали 268 размороженных эмбрионов нехирургическим путем 190 коровам, подведенным под синхронизацию, из которых 105 (55,26%) зачали. Скоростной метод замораживания на базе 1,5 М глицерина и размораживания в присутствии 1,1 М сахарозы представляется эффективным и пригодным для практики, так как обеспечивает не только достаточную выживаемость эмбрионов и их прививаемость в матке, но и значительно сокращает срок процессов замораживания и размораживания.

трансфер; эквilibрация; замораживание; размораживание; сидинг

HOLÝ, L. — JIŘÍČEK, A. — ŽÁK, M. — ČAPEKOVÁ, M. — DVOŘÁKOVÁ, V. — LOPATÁŘOVÁ, M. (University of Veterinary Medicine, Brno; Slušovice Co-operative Farm): **The Use of a Rapid Method of Cryopreservation of Bovine Embryos for Non-Surgical Embryo Transfer.** Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 577-584.

The embryos were frozen and thawed in Cassou minipaillette by a rapid method. Embryos with cryoprotective agent (glycerol, 1.5 M) were placed directly into the freezing medium at the temperature of -6 to -7°C , frozen after seeding at the

temperature decrease by 0.3 to 0.5 °C per minute to the temperature of -32 °C and then transferred directly into liquid nitrogen. They were thawed in a bath warm 20 to 37 °C. After thawing the cryoprotective agent was evacuated in 1.1 M sucrose. The best-quality embryos were selected for freezing. Out of these 366 were thawed so far, with average survival of 74.31 %. The total of 268 thawed embryos were transferred ipsilaterally, by a non-surgical method, to 190 synchronised heifers, out of which 105 (55.26 %) got in calf. Rapid freezing method based on 1.5 M of glycerol and thawing at the presence of 1.1 M sucrose proved effective and suitable for practice, as not only sufficient reviviscence of embryos and their survival in womb are guaranteed, but also a substantial shortening of the freezing as well as thawing process.

embryo transfer; equilibration; freezing; thawing; seeding

HOLÝ, L. — JIŘÍČEK, A. — ŽÁK, M. — ČAPEKOVÁ, M. — DVOŘÁKOVÁ, V. — LOPATÁŘOVÁ, M. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno; Landwirtschaftliche Produktionsgenossenschaft Slušovice): *Anwendung einer raschen Methode der Kryokonservierung von Rinderembryonen bei nicht chirurgischem Transfer in der Transplantationspraxis*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 577-584.

Die Embryonen wurden durch die rasche Methode in Casseau-Minipipetten eingefroren und aufgetaut. Die Embryonen mit dem Kryoprotektivum (Glyzerin 1,5 M) wurden direkt in das Kühlmedium von -6 bis -7 °C Temperatur hineingetan, nach dem Seeding bei einer Abkühlungsgeschwindigkeit von 0,3 bis 0,5 °C pro Minute bis auf -32 °C abgekühlt und danach direkt in flüssigen Stickstoff übertragen. Das Auftauen erfolgte im Wasserbad von 20 bis 37 °C Wärme. Nach dem Auftauen wurde das Kryoprotektivum in einem Milieu von 1,1 M Sacharose evakuiert. Zur Einfrierung wurden Embryonen von bester Qualität herangezogen. Davon wurden bisher 366 Stück mit einer mittleren Überlebensrate von 74,31 % aufgetaut. Insgesamt wurden 268 Embryonen ipsilateral auf nicht chirurgischem Wege an 190 ausgesuchte synchronisierte Färsen übertragen, wovon 105 der rezipierenden Kühe (55,26 %) trächtig wurden. Die rasche Methode einer Tiefkühlung auf der Basis von 1,5 M Glyzerin und ein Auftauen unter Vorhandensein von 1,1 M Sacharose erwies sich als effektiv und für die Praxis gut geeignet, da sie nicht nur eine ausreichende Reviviszenz der Embryonen und ihr Überleben in der Gebärmutter, sondern auch eine wesentliche Verkürzung der Dauer sowohl des Einfrier- als auch des Auftauprozesses gewährleistet.

Embryonentransfer; Äquilibrierung; Tiefkühlung; Auftauen; Seeding

Adresa autorů:

Doc. MVDr. Luboš Holý, CSc., MVDr. Antonín Jiříček, MVDr. Miroslav Žák, MVDr. Mária Čapeková, MVDr. Vratislava Dvořáková, MVDr. Miloslava Lopatářová, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

V. Kyllar, J. Ryjáček, J. Šterc, S. Čech

KYLLAR, V. — RYJÁČEK, J. — ŠTERC, J. — ČECH, S. (Vysoká škola veterinární, Brno): *Výskyt a léčba dermatitis digitalis u dojníc*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 585-594.

U dojníc plemen černostrakaté nížinné, české strakaté a jejich kříženek, chovaných ve VKK 900 s volným roštovým ustájením, jsme v průběhu jednoho roku zjistili 24% incidenci *dermatitis digitalis*. Sledovali jsme závislost výskytu tohoto onemocnění na věku a užitkovosti dojníc, na období porodu a na sezónním období. Hodnotili jsme a porovnávali terapeutický efekt několika metod léčby. Vliv věku a užitkovosti dojníc, stejně jako vliv sezónního období na výskyt tohoto onemocnění nebyl zjištěn. Průkazně vyšší výskyt byl prokázán v období před porodem a po něm, kdy bylo diagnostikováno 80 % všech zjištěných případů *dermatitis digitalis*. V tomto období však byly dojnice ustájeny ve stáji s výrazně horšími zoohygienickými podmínkami, než jaké byly v produkční stáji. 91 % zánětů kůže postihovalo prsty pánevních končetin. Recidivy onemocnění byly zjištěny pouze u pěti dojníc. Ani v jednom případě se onemocnění nevyskytovalo u telat odchovaných v profylaktoriu porodního oddělení VKK. Terapeutické výsledky byly nejlepší po opakovaném hromadném ošetření prstů dojníc koupelemi v 5% formaldehydu. Výsledky naší práce nás vedou k závěru, že pravděpodobným původcem onemocnění je specifické infekční agens, popřípadě že je více spolupůsobících původců. Významným predispozičním činitelem jsou špatné zoohygienické podmínky.

skot; paznehty; terapie

Choroby prstů skotu hrají v chovech dojníc stále významnou roli a vedle poruch reprodukce, metabolických poruch a mastitid jsou nejzávažnějším faktorem snižování efektivnosti výroby mléka ve velkovýrobních technologiích (E d w a r d s, 1980).

Podle primárně postižené tkáně lze rozdělit choroby prstů skotu na nemoci škáry a rohoviny paznehtu a na nemoci kůže prstu. V posledních letech se v mnohých chovech dojníc u nás i v zahraničí stále častěji vyskytují závažné formy onemocnění kůže, zatímco nemoci vlastních paznehtů se vyskytují méně často. Jednou z příčin je pravidelná a odborná úprava paznehtů, podstatně snižující působení etiologických faktorů nemocí škáry, zatímco biologický charakter chovu dojníc nemůže zcela vyloučit působení vnějšího mikroprostředí prstu, které je hlavním predispozičním a etiologickým faktorem nemocí kůže prstů dojníc.

Mezi tato onemocnění, která mají většinou hromadný výskyt, patří nekrobacilóza, *dermatitis interdigitalis* a v poslední době stále častěji se vyskytující *dermatitis digitalis*.

Jako vůbec první popsali toto onemocnění Cheli a Mortelaro (1974), kteří je charakterizují jako zánět epidermis a podkoží před interdigitálním prostorem nebo těsně za ním. Jednotlivá ložiska



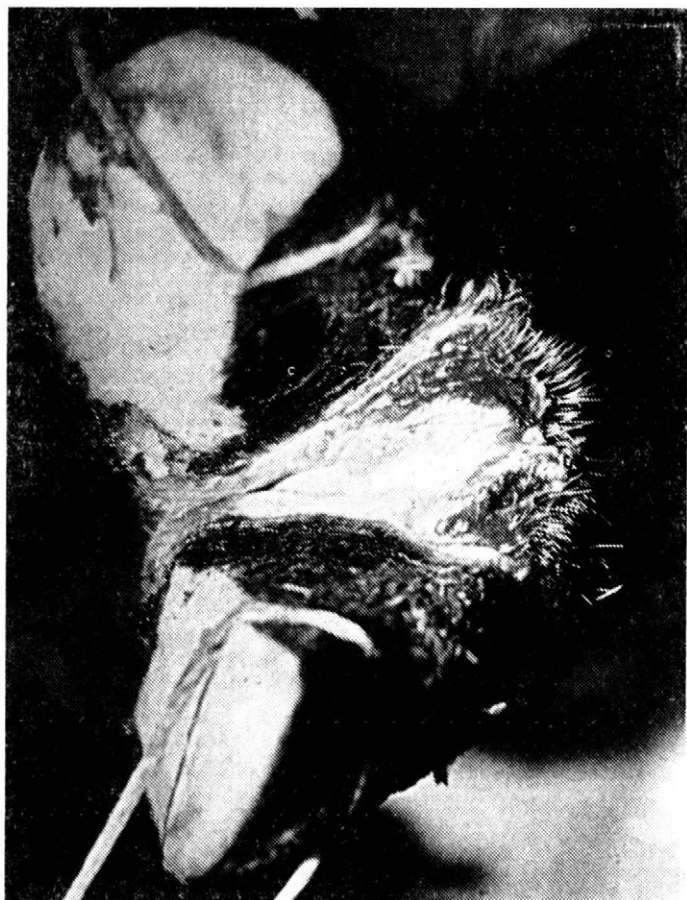
1. Charakteristická ložiska *dermatitis digitalis* s typickou lokalizací na rozhraní rohoviny a kůže patek — Characteristic lesions of *dermatitis digitalis* with typical localization between the horn and the skin of frogs

jsou ohraničena, mají konkávní tvar. Onemocnění se může rozšířit do interdigitálního prostoru, na patky i škáru paznehtu. Postižená zvířata silně kulhají. Onemocnění postihuje 40 až 70 % zvířat stáda všech věkových kategorií, především však dojnice v laktaci bez závislosti na technologii ustájení [Cheli a Mortellaro, 1974; Morris, 1978].

Na ložisku zánětu se netvoří krusta a ložisko často zůstává i několik měsíců beze změny. Ložiskový zánět není doprovázen lokální reakcí, ložiska jsou velmi bolestivá na dotyk a snadno krvácejí [Toussaint Raven, 1981]. Celkový zdravotní stav není narušen, onemocnění se ve stádě vyskytuje postupně; po vyléčení nemocných kusů se vyskytnou nové případy u jiných dojnic [Cornelisse aj., 1981; Weaver aj., 1981]. Etiologie je neznámá, doposud se nepodařilo stanovit specifické mikroby ani plísně, které by onemocnění vyvolávaly [Cheli a Mortellaro, 1974; Cornelisse aj., 1981; Toussaint Raven, 1981]. Toussaint Raven (1981) uvádí i první informace o terapii. Nejlepších výsledků dosáhl s jednorázovou lokální aplikací Teramycinu s genciánovou violetí ve formě spraye bez přiložení obvazu.

U nás toto onemocnění poprvé popsali Kvllar a Roztočil (1983) a charakterizují je jako povrchový ohraničený zánět kůže prstu sérózního charakteru s typickou lokalizací v nejtěsnější blízkosti ko-

2. Ložiska *dermatitis digitalis* v interdigitálním prostoru — Lesions of *dermatitis digitalis* in interdigital space



runkového okraje či na rozhraní kůže a rohoviny (obr. 1), postihující tak škáru hraniční, korunkovou, popř. patkovou a vyvolávající silné kulhání. Typická ložiska mají kruhový nebo oválný tvar, různou velikost, sytě červenou barvu, na průřezu jsou konkávní, nemají tendenci šířit se do hloubky a do okolí. Výjimečná nejsou ložiska rozsáhlejší, nepravidelného tvaru bez zřetelného ohraničení, postihující celou patkovou část paznehtu nebo kůži interdigitálního prostoru (obr. 2). Autoři rovněž ani v jednom případě nepozorovali narušení celkového zdravotního stavu.

Přesnější údaje o výskytu tohoto onemocnění z hlediska plemenné příslušnosti, věku a užitkovosti dojnic, lokalizace na končetinách ap., stejně jako obsáhlejší informace o terapii, dosud v literatuře chybí.

MATERIÁL A METODY

Onemocnění jsme sledovali v provozních podmínkách VKK 900 na jižní Moravě v období od dubna 1982 do května 1983. Provozně technologicky byla farma rozdělena do tří odlišných typů stájí. Produkční stáj jako volné bezstělivové roštové ustájení s odděleními pro 40 dojnic a s možností výběhu v ohradách s betonovou podlahou. Dva až jeden měsíc před porodem se dojnice převáděly na volné stělivové ustájení s denním odklizením hnoje. Porodní oddělení je vazné stělivové, s dlouhým a středním stáním a oběžným shrnovačem hnoje. Z hlediska plemenné příslušnosti se jednalo o kříženko plemen černostrakaté nížinné a české strakaté

s různým podílem krve. Průměrná užitkovost dojnic se ve sledovaném období pohybovala okolo 3400 litrů mléka za rok s tučností mléka 4,9 %. Servis perioda činila 87,9 při indexu zabřezávání 1,6 a celkovém procentu březosti ze stavu krav 102,5. Krmná dávka v tomto období byla vyrovnaná, odpovídající užitkovosti dojnic. Byla založena na celoročním zkrmování kukuřičné siláže a upravována podle výsledků pravidelně prováděných metabolických testů. Nejzávažnějšími zdravotními problémy byly především poruchy reprodukce, mastitidy a nemoci končetin, které byly nejčastějším důvodem nutných porážek a vyřazování dojnic.

Všechny případy *dermatitis digitalis* byly diagnostikovány na základě klinických příznaků, tj. především kulhání, popřípadě při pravidelných úpravách paznehtů. Byla sledována závislost výskytu onemocnění na věku a užitkovosti dojnic, fázi reprodukčního cyklu, resp. na termínu porodu, sezónním obdobím a lokalizací ložisek na končetinách.

Při výběru terapeutické metody bylo kromě zajištění léčebného efektu přihlíženo k dostupnosti, ekonomickým nákladům, jednoduchosti aplikace, popř. možnosti hromadného použití léku. Při léčbě jsme použili několika postupů:

1. lokální aplikace *pix liquida* bez přiložení obvazu;
2. lokální aplikace *pix liquida* s přiložením lehkého krycího obvazu;
3. důkladný povrchový seškrab tkáně v místě ložiska zánětu s lokální aplikací Sulfathiazol ung. nebo Sulfopen Spofa pulv. a přiložením krycího obvazu;
4. hromadné ošetření končetin dojnic v 5% roztoku formaldehydu formou koupelí prstů po dobu jedné hodiny ve speciálních betonových vanách s možností uvázání stojících dojnic; koupele se opakovaly v týdenních intervalech.

S výjimkou koupelí byla léčba provedena vždy po pečlivém a šetrném omytí a osušení ložiska zánětu a jeho okolí na dojnici fixované ve speciální kleci. Výsledky léčby byly hodnoceny na základě klinického vyšetření prstů sedmý až devátý den a třináctý až šestnáctý den po její první aplikaci. V těchto intervalech byla také v případech, kdy se prsty nezhojily, léčba opakována stejnou, popř. jinou metodou. V celém našem sledování jsme museli respektovat ekonomický zájem podniku, který spočíval v co nejrychleji možném vyléčení jednotlivých dojnic a v úplné likvidaci onemocnění ve stádě.

VÝSLEDKY

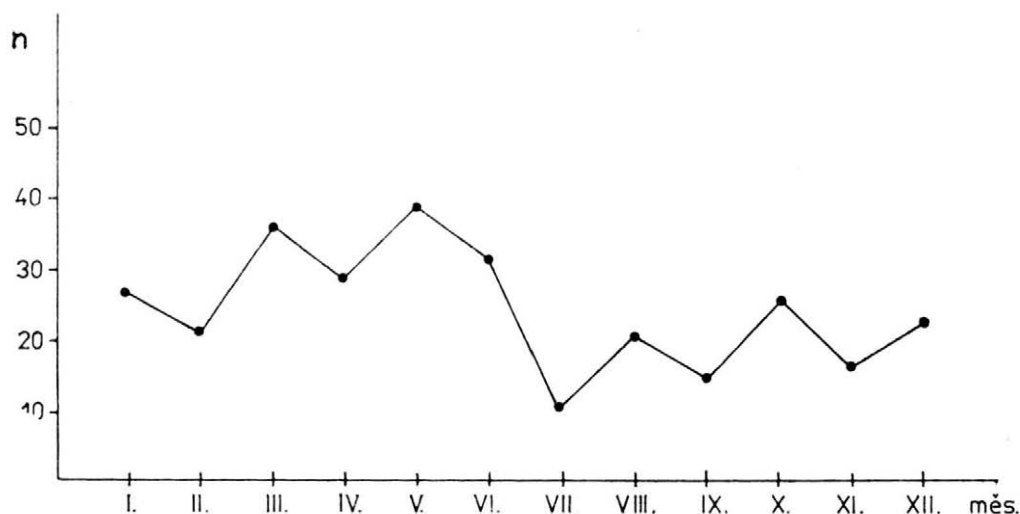
Za sledované období bylo v daném chovu diagnostikováno celkem 287 případů *dermatitis digitalis* u 217 dojnic, což bylo 24 % celkového stavu stáda. U některých kusů se onemocnění vyskytlo současně na více končetinách nebo na jedné končetině na více místech.

Nebyla zjištěna závislost výskytu onemocnění na věku postižených dojnic. *Dermatitis digitalis* se vyskytovala u všech věkových kategorií stáda. Z celkového počtu 207 hodnocených dojnic bylo 43,9 % do tří let a 29 % do čtyř let věku. Dojnice těchto věkových kategorií tvořily přibližně 80 % stavu. U dojnic do pěti let se vyskytlo 14 % a u dojnic starších než pět let 13,1 % všech zjištěných případů *dermatitis digitalis*. U telat v profylaktoriu nebyla dermatitida diagnostikována.

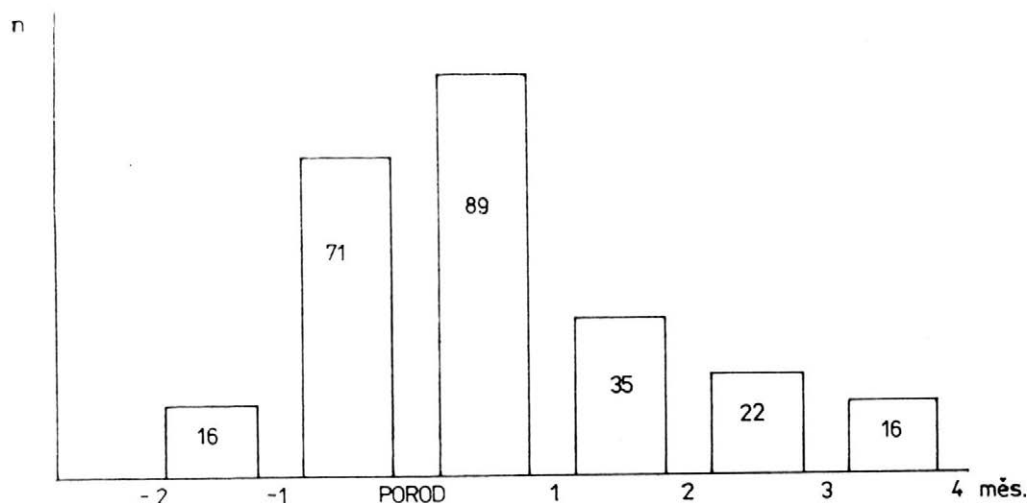
V naší práci nebyl prokázán sezónní charakter výskytu onemocnění. Onemocnění se vyskytovalo pravidelně v průběhu celého roku (obr. 3). Mírné rozdíly ve výskytu podle jednotlivých měsíců nejsou průkazné již vzhledem k variabilitě časového odstupu od vzniku onemocnění k jeho diagnostikování.

Nebyla prokázána ani závislost výskytu onemocnění na užitkovosti dojnic. Onemocnění postihovalo dojnice všech kategorií užitkovosti. V daném závodě však kategorie nebyly výrazně odlišné. 51,8 % případů dermatitidy bylo diagnostikováno u dojnic s průměrnou užitkovostí stáda.

Zcela průkazné bylo zvýšení incidence onemocnění v závislosti na termínu porodu. V období měsíc před porodem až měsíc po porodu se



3. Výskyt *dermatitis digitalis* v průběhu roku — The occurrence of *dermatitis digitalis* during the year



4. Závislost *dermatitis digitalis* na termínu porodu — The dependence of *dermatitis digitalis* on calving date

vyskytovalo 61 % případů, v období dva měsíce před porodem až dva měsíce po porodu to bylo dokonce 211 případů, tj. 80,5 % z celkového počtu 262 hodnocených případů (obr. 4).

Výrazný rozdíl byl rovněž zjištěn v postižení hrudních a pánevních končetin. 261 případů *dermatitis digitalis*, tj. 90,9 %, bylo lokalizováno na prstech pánevních končetin, zatímco pouze 26 případů bylo diagnostikováno na prstech hrudních končetin.

Z hlediska lokalizace ložisek zánětu kůže na končetinách bylo hodnoceno všech 287 diagnostikovaných případů (tab. I). Na plantární, resp. palmární ploše prstu v oblasti patek bylo lokalizováno 182 případů, tj. 63,4 %. V interdigitálním prostoru bylo diagnostikováno 70 případů (24,4 %). 27 případů bylo na dorzální ploše prstu na rozhraní

I. Lokalizace *dermatitis digitalis* na prstu dojníc — Localization of *dermatitis digitalis* on the digit of dairy cows

Lokalizace	Palmárné patky	Dorzálné	Inter-digitální prostor	Chodidlová plocha	Paznehtky	Celkem	Pánevní	Hrudní
Počet	182	27	70	6	2	287	261	26
Procento	63,4	9,4	24,4	2,1	0,6	100	90,9	9,1

II. Výsledky použitých metod léčby *dermatitis digitalis* — Results of the applied method of treatment of *dermatitis digitalis*

Metoda léčby	Celkem ošetřeno	Zhojeno					
		po první aplikaci		po druhé aplikaci		celkem	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>Pix liquida</i> bez obvazu	25	10	40,0	4	16,0	14	56,0
<i>Pix liquida</i> s obvazem	78	36	46,2	15	19,2	51	65,4
Seškrab + sulfonamid	41	23	56,1	11	26,8	34	82,9
Formaldehyd 5 %	65	42	64,6	17	26,1	59	90,7

kůže a rohoviny, z toho v šesti případech došlo k poruše tvorby rohoviny stěny paznehtu a vzniku rozštěpu. V šesti případech byla ložiska dermatitidy lokalizována přímo na chodidlové ploše. Dva případy byly v oblasti paznehtku. Proximálně od paznehtků nebyla *dermatitis digitalis* diagnostikována.

Recidivy onemocnění byly zjištěny pouze u pěti dojníc.

Výsledky jednotlivých použitých metod léčby jsou uvedeny v tab. II.

Po první aplikaci *pix liquida* na ložiska zánětu bez přiložení obvazu se z celkově ošetřených 25 případů zhojilo deset, tj. 40 %. Po druhé aplikaci se zhojily čtyři případy, tj. 16 % z celkového počtu takto ošetřených. Po ošetření dehtem s přiložením lehkého nepodloženého obvazu došlo ke zhojení po první aplikaci u 46,2 %, po druhé aplikaci u 19,2 % ze 78 takto ošetřených případů *dermatitis digitalis*.

Jednorázový seškrab ložiska s přiložením sulfathiazolové masti kryté lehkým obvazem vedl ke zhojení u 56,1 % ze 41 takto ošetřeného případu. Po opakovaném stejném ošetření se zhojilo dalších 26,8 %. Celkově tedy bylo touto metodou vyléčeno 82 % ošetřených případů *dermatitis digitalis*. Podobného terapeutického efektu bylo dosaženo seškrabem ložiska se zásypem sulfopenu a přiložením krycího obvazu (tab. II).

Nejlépeších terapeutických výsledků bylo dosaženo po jednorázovém i opakovaném použití koupelí prstů dojníc v 5% roztoku formaldehydu po dobu jedné hodiny. Ze 65 takto ošetřených případů se po jednorázové koupeli zhojilo 64,6 % případů *dermatitis digitalis*. U nezhojených případů byla v intervalu jednoho týdne provedena druhá koupel, po které

se zhojilo dalších 17 (26,1 %) případů. Celkově tedy bylo zhojeno 90,7 % námi ošetřených případů *dermatitis digitalis*.

DISKUSE

Jedním z nejvýznamnějších etiologických faktorů nemocí prstů skotu jsou špatné zootechnické podmínky. Vliv vnějšího prostředí je zvláště významný u nemocí kůže prstu. Stálá vlhkost, macerace kůže, působení výkalů, moče a mechanické dráždění jsou spolu s mikrobiální kontaminací ve větší či menší míře hlavními faktory prostředí ovlivňujícími zdravotní stav prstů dojníc ve všech formách ustájení (Bondarenko, 1960; Hendrikse, 1964; Greenough, 1962; Greenfield aj., 1972; Steffert, 1978; Greenough aj., 1981). 24% incidencí v průběhu jednoho roku se *dermatitis digitalis* stala nejzávažnějším zdravotním problémem sledovaného chovu, negativně ovlivňujícím mléčnou užitkovost. Vysoký výskyt onemocnění a další výsledky našich sledování, uvedené v této práci, podporují důležitost negativního působení špatných zoohygienických podmínek mikroprostředí končetin na zdravotní stav prstů skotu.

V souladu s údaji mnohých autorů (Gilder, 1960; Toussaint Raven a Cornelisse, 1971; Weaver aj., 1981 a jiní) jsme ani v naší práci neprokázali závislost výskytu dermatitidy na věku a užitkovosti dojníc. Nemoci kůže prstů na rozdíl od nemocí škáry paznehtu postihují dojnice všech věkových kategorií bez závislosti na jejich užitkovosti. I tento fakt svědčí o převaze vnějších etiologických faktorů nad vlivy vnitřními.

Na rozdíl od většiny autorů zabývajících se problematikou nemocí kůže prstů (Candlin, 1947; Smedegaard, 1964; Amstutz, 1965; Dirksen, 1978; Greenough aj., 1981) jsme v našem sledování nezjistili sezónní charakter výskytu *dermatitis digitalis*. Roční období se z hlediska etiologie nemocí prstů skotu obecně, a konkrétně nemocí kůže prstů, projevuje především změnami zoohygienického charakteru prostředí končetin v závislosti na způsobu chovu, resp. na změnách technologie ustájení v jednotlivých ročních obdobích (střídání stájového a pastevního chovu ap.). Dalšími faktory sezónního období jsou vlivy výživy, především změny a složení krmných dávek, změny klimatu v průběhu roku (teplota, vlhkost), popřípadě i vlivy pokročilé gravidity a skupinových porodů převažujících v určitém ročním období.

Výrazný rozdíl v postižení pánevních a hrudních končetin (v 90 % byly postiženy prsty pánevních končetin), zjištěný v naší práci, stejně jako lokalizace ložisek na končetině, rovněž svědčí o etiologickém a predispozičním působení mikroprostředí končetin a prstů dojníc na vznik *dermatitis digitalis*.

V období dva až jeden měsíc před porodem jsou dojnice sledovaného chovu převáděny z produkční bezstelivové roštové stáje na volné stélivové ustájení, kde je v důsledku velké koncentrace dojníc a typu ustájení značně nepříznivé mikroprostředí končetin z hlediska jejich zdravotního stavu. Ve srovnání s produkční stájí jsou zde prsty dojníc trvale vystaveny velké vlhkosti, chemickému i mechanickému působení výkalů a moče. Mechanické dráždění a stálá macerace kůže prstů jsou predispozicí pro působení infekčních agens značně kontaminovaného prostředí (Hendrikse, 1964; Egerton a Laing, 1978;

Greenough aj., 1981). Tato skutečnost proto může vysvětlovat výrazné zvýšení incidence dermatitidy v období před porodem a po něm. Pokročilá gravidita, porod i začátek laktace jsou zvláště u vysokoproduktivních dojnic značným zatížením organismu a kladou zvýšené nároky na komplexní péči o dojnici, ve které zaujímá důležité místo krmná dávka. Nevhodná a nedostatečná výživa je v tomto období častou příčinou metabolických poruch. Experimentálně bylo prokázáno, že u dojnic se subklinickými chronickými acidózami je podstatně snížena tvorba protilátek (Bouda, 1979; Jagoš a Bouda, 1981). Snížená odolnost organismu v tomto období rovněž může být jedním z faktorů polyfaktoriální etiologie *dermatitis digitalis*.

Postupným šířením ve stádě připomínalo onemocnění stájovou infekci. Zatímco se léčené případy postupně hojily, objevovaly se nové případy u jiných dojnic. Recidivy onemocnění byly klinicky diagnostikovány pouze u pěti dojnic z celkových 287 případů u 217 kusů. Tato skutečnost opravňuje k domněnce, že prodělání nemoci vede ke vzniku imunitní odezvy.

Uvedené závěry, stejně jako klinicko-patologický obraz onemocnění, charakter stájové infekce a minimální množství recidiv nás vedou k předpokladu, že původcem onemocnění je podobně jako u nekrobaciózy a *dermatitis interdigitalis* mikrobiální, popř. virové agens, event. více původců synergicky působících.

Dosavadní sledování většiny autorů byla částečně zaměřena i tímto směrem, ale literární údaje neuvádějí výskyt specifického agens, jež by mohlo mít významnější etiologický význam (Cheli a Mortellaro, 1974; Cornellise aj., 1981; Toussaint Raven, 1981). Doposud pouze Cornellise aj. (1982) uvádějí relativně častý výskyt *Campylobacter fecalis*.

První a dosud jedině údaje o léčbě *dermatitis digitalis* uvedl Toussaint Raven (1981). Terapeuticky efektivní bylo jednorázové lokální použití genciánové violeti s tetracyklinem nebo aureomycinem ve formě spraye. Povrchová lokální aplikace genciánové violeti a Chronicinu spraye, použitá již dříve na naší klinice, měla negativní výsledky.

Porovnání účinnosti několika metod léčby *dermatitis digitalis*, uvedené v této práci, jednoznačně svědčí pro použití koupelí prstů dojnic v 5% roztoku formaldehydu, a podporuje tak nejen terapeutický, ale i preventivní význam tohoto hromadného ošetření prstů skotu. Hodinové koupele prstů dojnic stojících v 5% formaldehydu ve zvláště pro tento účel vybudovaných vanách s kapacitou 20 až 30 kusů po několikerém opakování v týdenních intervalech podstatně snížily incidenci onemocnění. Z dosud běžně používaných metod léčby nemocí prstů skotu je tato forma nejvýhodnější nejen pro své terapeutické výsledky a možnosti hromadné aplikace, ale i pro nízké ekonomické náklady, jednoduché použití a s tím související malou personální a časovou náročnost. Významná je i výhodnost použití formalinových koupelí z hlediska šetrnosti k ošetřovaným dojnícím ve srovnání s ostatními metodami, které vyžadují použití fixační klece, což představuje výrazný stresový faktor zvláště u dojnic ve vysokém stadiu gravidity.

Betonové vany pro hromadné koupele prstů dojnic, stejně jako pravidelná odborná úprava paznehtů, by proto měly být součástí podniků a péče o dojnice především na farmách s větší koncentrací zvířat. Výsledky uvedené v naší práci by pro to měly být pouze dalším důvodem.

Literatura

- AMSTUTZ, H. E.: Cattle lameness. J. Amer. veter. med. Assoc., 147, 1965, s. 333-344.
- BONDARKO, D. N.: Léčení nekrobacilózy skotu. Veterinarija, 1960, s. 42.
- BOUDA, J.: Význam biochemických ukazatelů pro diagnostiku onemocnění telat a studium metabolických vztahů mezi matkou a mládětem. [Habilitační práce.] Brno 1979. — Vysoká škola veterinární.
- CANDLIN, F. T.: The use of sodium sulfamerazine in foot rot. J. Amer. veter. med. Assoc., 111, 1947, s. 278.
- CORNELISSE, J. L. — PETERSE, D. J. — TOUSSAINT RAVEN, E.: A digital disorders in dairy cattle. *Dermatitis digitalis*. Tijdschr. Diergeneesk., 106, 1981, s. 452-455.
- CORNELISSE, J. L. — VAN ASTEN, A. J. — PETERSE, D. J. — TOUSSAINT RAVEN, E.: *Campylobacter fecalis* as a participation of the bacterial flora of *dermatitis digitalis* in cows. In: Sbor. Ref. IV. mezinár. Symp. On disorders of ruminant digit. Paříž 1982. s. 3-6.
- DIRKSEN, G.: Nemoci kůže prstu. In: ROSENBERG, G.: Krankheiten des Rindes. Paul Parey 1978, s. 573-594.
- EDWARDS, J. R. — LAING, E. A.: Bacterial infection in the etiology of foot diseases of ruminants. In: Sbor. Ref. II. mezinár. Symp. On disorders of ruminant digit. Skåra 1978.
- GILDER, R. P.: Foot diseases of cattle. Austral. veter. J., 36, 1960, s. 151-154.
- GREENFIELD, J. — BIGLAND, C. H. — MILLIGAN, J. D.: Control of bovine foot rot by treatment of feedlot litter with paraformaldehyde. Br. veter. J., 128, 1972, s. 578-583.
- GREENOUGH, P. R.: Some disorders of cattle digits. Veter. Rec., 74, 1962, s. 1-9; 53-63.
- GREENOUGH, P. R. — MAC CALUM, F. J. — WEAVER, A. D.: Metabolic diseases affecting digits. Diseases of the skin of digits. In: Lameness in cattle. 2. vyd. Bristol, Wright and Sons 1981, s. 219-227.
- HENDRIKSE, R. P.: The interdigital panaritium in the cow. Tijdschr. Diergeneesk., 89, 1964, s. 212-222.
- CHELI, R. — MORTELLARO, C.: *Dermatitis digitalis* u skotu. In: Sbor.: 8. mezinár. konference o nemocech skotu. Milán 1974, s. 208-214.
- JAGOŠ, P. — BOUDA, J.: Zásady prevence ztrát u telat. Pardubice, SVS 1981.
- KYLLAR, V. — ROZTOČIL, V.: *Dermatitis digitalis* — onemocnění prstu skotu. Veterinářství, 33, 1983, s. 323-325.
- MORRIS, G. R.: Terminology of foot diseases. In: Sbor. Ref. 8. Semin. NZVA, 1978, s. 49-51.
- SMEDEGAARD, H. H.: Foot rot or chronic foot rot. Nord. Veter.-Med., 16, 1964, s. 44-63.
- STEFFERT, I. J.: Conformation and foot disease in beef cattle. In: Sbor. Ref. 8. Semin. NZVA, 1978, s. 47-48.
- TOUSSAINT RAVEN, E.: Onemocnění prstu skotu — *dermatitis digitalis*. In: Sbor. Ref. věd. Konf. Brno 1981, s. 41-42.
- TOUSSAINT RAVEN, E. — CORNELISSE, J. L.: The specific contagious inflammation of the interdigital skin in cattle. Veter. med. Rev., 1971, s. 223-247.
- WEAVER, A. D. — ANDERSSON, L. — BANTING, A. L. — DEMERTZ'S, P. N.: a další: Review of disorders of the ruminant digit with proposal for anatomic and pathological terminology and recording. Veter. Rec., 108, 1981, s. 117-120.

Došlo dne 21. 1. 1985

КИЛЛАР, В. — РЫЯЧЕК, Й. — ШТЕРЦ, Я. — ЧЕХ, С. (Институт ветеринарии, Брно): Распространение и лечение *dermatitis digitalis* у коров. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 585-594.

У коров черно-пестрой низменной, чешской пестрой пород и их помесей, содержащихся в ВVK 900 без привязи на решетках, в течение года определили 24% случаев *dermatitis digitalis*. Устанавливали зависимость заболевания от возраста и продуктивности коров, от срока отела и сезона. Оценивали и сравнивали терапевтический эффект нескольких способов лечения. Не отмечено влияния ни возраста, ни продуктивности или сезонного периода на заболевание. Достоверно больше случаев отмечено до и после отела: 80% всех случаев. Однако именно в этот период коров

содержали в значительно худших условиях, чем в продуктивном коровнике. 91% воспалений касались копыт бедренных конечностей. Рецидивы имели место лишь в 5 случаях. Не отмечено заболевания ни у одного теленка в профилактории родильного помещения VKK. Терапевтические результаты оптимальны после повторной массовой обработки копыт коров в водяной бане с 5% формальдегида. Эти данные ведут нас к выводу, что очевидным возбудителем болезни является специфич. инфекционный реагент или же существует несколько взаимосвязанных возбудителей. Важный предрасполагающий фактор — и плохие зоогигиенические условия. крупный рогатый скот; копыта; терапия

KYLLAR, V. — RYJÁČEK, J. — ŠTERC, J. — ČECH, S. (University of Veterinary Medicine, Brno): *Occurrence and Treatment of Dermatitis Digitalis in Dairy Cows*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 585-594.

In dairy cows of the Black Pied Lowland, Bohemian Pied breeds and their cross-breeds loosely housed in large cow houses VKK 900 on slatted floors, 24% incidence of *dermatitis digitalis* was recorded during the period of one year. Relations between the occurrence of this disease, age and efficiency of dairy cows, time of parturition and season of the year were studied. Therapeutical effects of several methods of treatment were evaluated and compared. No effect of age and efficiency of dairy cows, nor of the year season on the occurrence of this disease was observed. A significantly higher occurrence was proved in the period before and after parturition, when 80% of the total occurrence of *digitalis dermatitis* were diagnosed. During this period, however, the cows were housed in a stable with markedly worse environmental circumstance than those in production stable. 91% cases of dermatitis were diagnosed on the digits of pelvic limbs. Relapses were determined only in five dairy cows. There was no case of the disease occurring in calves reared in the prophylactorium of the calf house. Therapeutical results were best after repeated mass treatment of the digits of dairy cows in 5% formaldehyde baths. The results of this study point at a conclusion that probable pathogens of this disease are specific infection agents, or that there are more synergic pathogens. A significant pre-disposition factor are bad environmental circumstances. cattle; hoofs; therapy

KYLLAR, V. — RYJÁČEK, J. — ŠTERC, J. — ČECH, S. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): *Auftreten und Behandlung von Dermatitis digitalis bei Milchkühen*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 585-594.

Bei Milchkühen der Rassen Schwarzbuntes Niederungsvieh, Böhmisches Fleckvieh und deren Kreuzungen, die in industriemäßigen Milchviehanlagen (Typ VKK 900 — mit 900 Aufstallungsplätzen) in Laufstallhaltung auf Vollspaltenboden gehalten wurden, verzeichneten wir im Verlauf eines Jahres eine 24%ige Inzidenz von *Dermatitis digitalis*. Wir untersuchten die Abhängigkeit des Auftretens dieser Erkrankung vom Alter und der Leistung der Kühe, vom Abkalbetermin und der Jahreszeit. Wir bewerteten und verglichen die therapeutische Wirkung mehrerer Behandlungsmethoden. Wir konnten keine Einwirkung des Alters und der Leistung, ebenso wie keinen Saisoneinfluß auf das Auftreten der Krankheit nachweisen. Eine bedeutend höhere Inzidenzrate wurde im Zeitraum vor dem Abkalben und unmittelbar danach verzeichnet, wo 80% aller ermittelten Fälle der *Dermatitis digitalis* diagnostiziert wurden. Zu dieser Zeit allerdings waren die Kühe in einem Stall aufgestellt, wo wesentlich schlechtere zoohygienische Bedingungen als im Produktionsstall herrschten. 91% der Hautentzündungen betraf Zehen der hinteren Extremitäten. Ein Krankheitsrückfall wurde nur bei fünf Kühen verzeichnet. In keinem einzigen Fall wurde diese Erkrankung bei im Kälberabteil des Abkalbestalls des VKK aufgezogenen Kälbern festgestellt. Beste therapeutische Ergebnisse gab es bei wiederholter massenhafter Behandlung der Zehen der Kühe durch Bäder in 5%iger Formaldehydlösung. Die Ergebnisse unserer Arbeit führen zur Schlußfolgerung, daß der vermutliche Erreger der Erkrankung ein spezifisches infektiöses Agens ist, bzw. daß es sich um mehrere zusammenwirkende Erreger handelt. Ein bedeutsamer Prädispositionsfaktor sind unbefriedigende zoohygienische Bedingungen.

Rind; Klauen; Therapie

Adresa autorů:

MVDr. Vladimír Kyllar, MVDr. Jiří Ryjáček, MVC. Jan Šterc, MVDr. Svatopluk Čech, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

HISTOMORFOLOGICKÉ ZMENY FOLIKULÁRNEHO APARÁTU VAJEČNÍKOV BAHNÍC PO OŽIARENÍ

J. Halagan, J. Arendarčík, M. Molnárová, A. Staníková

HALAGAN, J. — ARENDARČÍK, J. — MOLNÁROVÁ, M. — STANÍKOVÁ, A. (Vysoká škola veterinárska, Košice): *Histomorfologické zmeny folikulárneho aparátu vaječníkov bahníc po ožiarení*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) :595-602.

Kvalitatívnu a mikrometrickou metódou sme študovali histologické zmeny primárnych folikulov bahníc po päťdňovom protrahovanom ožiarení gama lúčmi. Pokus sme vykonali v anestríckom období na 21 ovciach plemena slovenské merino, rozdelených do troch skupín. Prvá kontrolná skupina (5 oviec) nebola ožiarená. Druhú a tretiu skupinu (po 8 ovciach) sme ožiarili gama lúčmi ^{60}Co počas piatich dní celkovou dávkou 4,8 Gy. Všetkým bahniciam, vrátane kontrolných, sme počas desiatich dní po ožiarení podávali Ampicilín Spofa 250 mg na kus a deň. Tretej skupine sme okrem toho denne podávali zmes vitamínov Roboran H v dávke 10 g na kus a deň. Zvieratá sme zabíjali v piatom dni ožarovania a v desiatom dni po ukončení ožarovania. Bežnou histologickou metódou spracované vaječníky sme krájali na 7 μm rezy v sérii 70 μm a farbili hematoxylin-eozínom. Kvalitatívnu histomorfologickou analýzou oocytov primárnych folikulov sme zistili agregáciu chromatinu, pyknózu jadier, výraznú acidofiliu cytoplazmy oocytov, ich zmršťovanie a rozpad. U nepoškodených primárnych folikulov sme po ožiarení zistili zastavenie mitotického delenia **folikulárnych buniek** a zvýšenie podielu folikulárnych buniek s pyknotickým jadrom. Dosiahnuté výsledky ukazujú, že päťdňové protrahované žiarenie gama lúčmi v celkovej dávke 4,8 Gy vyvoláva výrazné degeneratívne zmeny v anestríckom období. Podanie antibiotík alebo vitamínov uvedené histomorfologické zmeny signifikantne neovplyvňuje.

primárne folikuly; žiarenie; anestrícké obdobie

Z výsledkov našich predchádzajúcich experimentálnych prác a z literárnych údajov jednoznačne vyplýva, že folikulárny aparát vaječníkov je citlivejší na účinok žiarenia ako luteálne štruktúry (Matsumoto, 1972; Halagan a i., 1980; Arendarčík a i., 1983). Po protrahovanom jednorazovom ožiarení vaječníkov oviec sme zaznamenali zvýšený počet atretických a znížený počet neatretických terciárnych folikulov (Tokoš a i., 1980). Podobné výsledky sme zaznamenali aj pri sledovaní účinku celotelového gama žiarenia na vaječníky (Arendarčík a i., 1983; Halagan a Arendarčík, 1983). S údajmi o pôsobení žiarenia na primárne folikuly vaječníkov zvierat sa stretávame málo. Väčšina dostupných experimentálnych prác sleduje vplyv žiarenia na primárne folikuly u malých laboratórnych zvierat (Baker, 1966; Mole a Papworth, 1966). Výsledky týchto prác sa zhodujú v zistení, že primárne oocyty folikulov s jednou vrstvou buniek vaječníkov sú na žiarenie citlivejšie ako oocyty folikulov s viacerými vrstvami. Reakcia primárnych folikulov je závislá nielen od dávky a charakteru žiarenia, ale aj od druhu, veku zvierata a štádia rastu folikulov.

Cieľom našej práce je prispieť k poznaniu raných histologických

zmien primárnych folikulov vaječníkov bahnic po ožiarení gama lúčmi a takto získať ďalšie údaje o vplyve žiarenia na zárodočnú funkciu vaječníkov oviec.

MATERIÁL A METÓDA

Pokusy sme vykonali v máji na 21 bahniciach plemena slovenské merino, trojročných až štvorročných, o priemernej hmotnosti 41 kg. Bahnice sme rozdelili na tri skupiny. Prvá skupina piatich bahnic bola kontrolná. Druhú a tretiu skupinu po ôsmich bahniciach sme ožiarili gama lúčmi ^{60}Co počas piatich dní celkovou dávkou 4,8 Gy. Obidvom skupinám oviec sme desať dní po ukončení ožarovania podávali Ampicilín Spofa *per os* v dávke 250 mg na kus a deň. Tretiu skupinu oviec sme celú sledovanú dobu prikrmovali vitamínovou zmesou Roboran H, v dávke 10 g na kus a deň. Ožiarené a kontrolné ovce sme postupne zabíjali vykrvaním piaty deň ožarovania a desiaty deň po jeho ukončení.

Vaječníky sme excidovali tesne po zabíí a fixovali v médiu formalín - sublimát - kyselina octová. Po vypratí, odvodnení a zaliatí do parafínu sme excízie krájali na 7 μm hrubé rezy v sérii s odstupom 70 μm . Rezy sme farbili hematoxylin-eozínom a hodnotili svetelnou mikroskopiou. Populáciu folikulov sme delili na skupiny primárnych, sekundárnych a terciárnych folikulov. Pre klasifikáciu sme použili kritériá podľa Blooma a Fawceta (1969). Kvalitatívne mikroskopické sledovanie sme zamerali na určovanie príznakov poškodenia oocytov primárnych folikulov. Kvantitatívne mikrometrickou metódou sme určovali veľkosť nepoškodených primárnych folikulov podľa Choudryho a i. (1968). U folikulárnych buniek uvedených folikulov sme určovali index mitózy a pyknózy z pomeru počtu buniek vykazujúcich príznaky mitotického delenia alebo pyknózy jadra k celkovému počtu folikulárnych buniek.

VÝSLEDKY

KVALITATÍVNE HISTOLOGICKÉ ZMENY

Rôzne štádiá a stupeň histologických zmien kôry vaječníka a primárnych folikulov vaječníkov po ožiarení uvádzame na mikrosnímках. V prvých dňoch po ožiarení oviec sme mikroskopickým pozorovaním vaječníkov zistili porušenie pravidelného usporiadania vrstvy folikulárnych buniek, kondenzáciu chromatinu jadra oocyta a jeho pyknózu. Počas desiatich dní po ožiarení sme zistili porušenie cytoplazmatickej membrány oocyta, rozpad jadra alebo celej zárodočnej bunky (obr. 1—4). Uvedené zmeny sú sprevádzané postupným hromadením okrúhlych jaderných buniek do priestoru poškodeného oocyta a edematóznymi zmenami okolitého tkaniva. Kvalitatívne histologické zmeny primárnych folikulov s väčším počtom vrstiev folikulárnych buniek uvádzame na obr. 5—8. Podobne ako u primárnych folikulov s jednou vrstvou folikulárnych buniek nastáva po ožiarení kondenzácia chromatinu (obr. 5), zakalenie cytoplazmy a jej scvrknutie (obr. 6). Mikroskopickým sledovaním folikulárnych buniek sme u týchto folikulov zaznamenali ich oddeľovanie od okolitého tkaniva, degeneráciu a vytváranie medzibunečných vakuol (obr. 7, 8).

KVANTITATÍVNE HISTOLOGICKÉ ZMENY

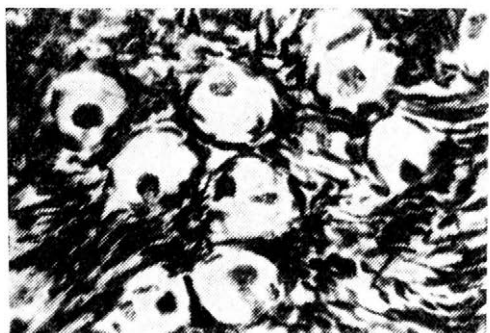
Výsledky percentuálneho podielu poškodených primárnych folikulov neožiarovaných vaječníkov a dvoch skupín ožiarovaných oviec uvádzame v tab. I. U obidvoch skupín ožiarovaných zvierat sme zaznamenali signifikantné zvýšenie percenta výskytu poškodených primárnych folikulov pri súčasnom znížení celkového počtu primárnych folikulov v jednom



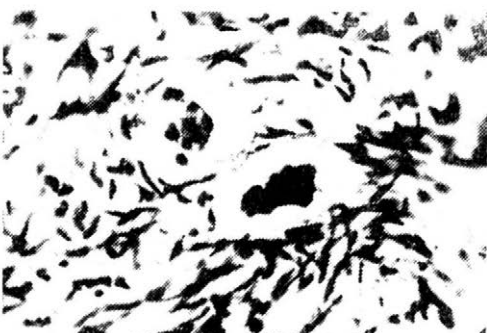
1. Primárne folikuly vaječníkov kontrolnej bahnice. Folikuly s výrazne ohraničeným jadrom oocyty, zreteľne vyvinutým jadriekom a pravidelne usporiadanou vrstvou folikulárnych buniek (farbenie HE) — Primary follicles of the ovaries of the control ewe. Follicles with markedly distinct boundaries of oocyte nucleus, clearly developed nucleolus and regularly arranged layer of follicular cells (HE-stained)



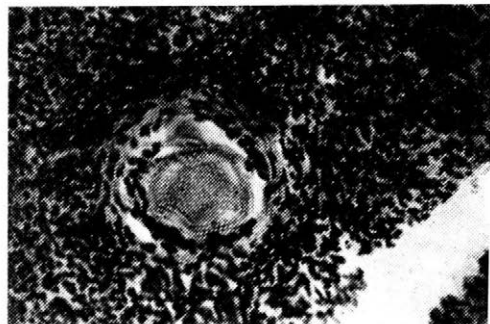
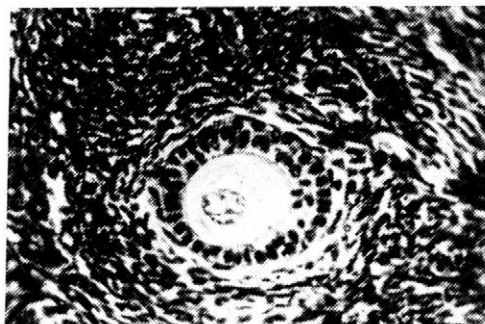
2. Kôrová časť vaječníka bahnice ožiarenej gama lúčmi, zabitej v piatom dni ožarovania. Folikul s počínajúcou agregáciou chromatinu jadra oocyty a pyknotickým jadrom. Výrazné zmnoženie fibroblastov (farbenie HE) — Cortical part of the ovary of ewes exposed to gamma rays, slaughtered on the fifth day of irradiation. Follicle with starting chromatin aggregation of oocyte nucleus and pyknotic nucleus. Pronounced multiplication of fibroblasts (HE-stained)



3. Kôrová časť vaječníka ovce ožiarenej gama lúčmi a zabitej v piatom dni ožarovania. Narušenie pravidelného usporiadania folikulových buniek, ich pyknóza a začínajúci rozpad jadier primárnych oocytov (farbenie HE) — Cortical part of the ovary of a ewe exposed to gamma rays and slaughtered on the fifth day of irradiation. Regular arrangement of follicular cells is impaired; their pyknosis and starting disintegration of the nuclei of primary oocytes (HE-stained)

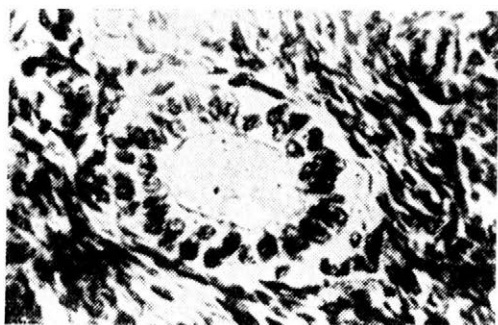


4. Kôra vaječníka ovce ožiarenej gama lúčmi, zabitej v desiatom dni po ukončení protrahovaného ožarovania. Poškodené primárne folikuly. Rozpad oocyty je sprevádzaný centrálnym hromadením folikulárnych buniek do priestoru poškodeného oocyty. Intersticiálne tkanivo vykazuje charakteristické príznaky edému vaječníka (farbenie HE) — Ovarian cortex of a ewe exposed to gamma rays, slaughtered on the tenth day after the end of protracted irradiation. Damaged primary follicles. Disintegration of oocyte is accompanied by central accumulation of follicular cells in the area of the damaged oocyte. Interstitial tissue displays characteristic symptoms of ovary oedema (HE-stained)



5. Primárny folikul s dvoma vrstvami folikulárných buniek vaječníka bahnice ožiarenej gama lúčmi, zabitej v piatom dni ožarovania. Agregácia chromatinu jadra oocyту. Usporiadanie folikulárných buniek neporušené (farbenie HE) — Primary follicle with two layers of follicular cells of the ovary of a ewe irradiated by gamma-rays, killed on the fifth day of irradiation. Aggregation of chromatin in oocyte nucleus. Arrangement of follicular cells undisturbed (HE-stained)

6. Časť kôrovej vrstvy vaječníka bahnice ožiarenej gama lúčmi, zabitej v piatom dni ožarovania. Hyperplázia intersticiálneho tkaniva vaječníka. Primárny folikul s poškodeným oocytom (farbenie HE) — Part of the cortical layer of the ovary of a ewe irradiated by gamma rays, killed on the fifth day of irradiation. Hyperplasia of ovary interstitial tissue. Primary follicle with a damaged oocyte (HE-stained)



7. Primárny folikul s dvoma vrstvami folikulárných buniek vaječníka ovce ožiarenej gama lúčmi, zabitej v desiatom dni po ožarení. Začínajúce oddeľovanie folikulárných buniek od okolitého tkaniva vaječníka (farbenie HE) — Primary follicle with two layers of follicular cells of the ovary of a ewe irradiated by gamma rays, killed on the tenth day after irradiation. Starting separation of follicular cells from the surrounding ovarian tissue (HE-stained)

8. Kôra vaječníka bahnice zabitej v desiatom dni po protrahovanom ožarení gama lúčmi. Pokročilý proces oddeľovania degenerovaných folikulárných buniek a ich postupné zhukovanie okolo poškodeného oocyту (farbenie HE) — Ovarian cortex of a ewe killed on the tenth day after protracted irradiation by gamma rays. Advanced process of separation of degenerated follicular cells and their gradual accumulation around the damaged oocyte (HE-stained)

vaječníku. Percento poškodenia primárnych folikulov u oviec zabitých v desiatom dni po ožarení je signifikantne vyššie ako u oviec zabitých v piatom dni ožarovania.

Hodnoty sledovania mitotickej aktivity a podielu buniek s pyknotickým jadrom uvádzame v tab. II. V oboch skupinách primárnych

I. Výsledky analýzy podielu poškodenia primárných folikulov vaječníkov bahníč zabíjajúcich v piatom dni ožarovania (5) a v desiatom dni po ukončení ožarovania (10) gama lúčmi — The results of analysis of the percentual damage of primary follicles of ovaries of ewes killed on the fifth day of exposure to irradiation (5) and on the tenth day after the end of irradiation (10) by gamma rays

Skupina bahníč	Počet folikulov		Percento poškodenia folikulov
	analyzovaných	poškodených	
Kontrolná	302	9	2,98
Ožiarená (5)	256	88	34,38
Ožiarená (10)	221	107	48,42

II. Hodnoty indexu mitózy a pyknózy primárných folikulov vaječníkov bahníč po ožiarení gama lúčmi — Values of the index of mitosis and pycnosis of primary follicles of ewes' ovaries after exposure to gamma-ray radiation

Skupina bahníč	Počet			Index	
	vrstiev folikulárných buniek	folikulárných buniek	folikulov	mitózy	pyknózy
Kontrolná	1	741	40	0,94	3,06
Ožiarená	1	1006	58	—	8,73
Kontrolná	2–3	938	16	0,64	7,68
Ožiarená	2–3	832	19	—	13,94

III. Priemerné hodnoty veľkosti primárných folikulov, oocytov primárných folikulov a jadier oocytov vaječníkov bahníč v anestre a po ožiarení gama lúčmi ($P < 0,05$) — Average values of the size of primary follicles, oocytes of primary follicles and nuclei of oocytes in the ovaries of ewes in anoestrus and after exposure to gamma-ray radiation ($P < 0,05$)

Skupina bahníč	Počet vrstiev folikulárných buniek	Priemerná plocha (log nm ²)		
		folikulu	oocytu	jadra oocytu
Kontrolná	1	4,874	2,438	1,991
Ožiarená	1	5,128	2,707	2,076
Kontrolná	2–3	5,405	2,896	2,299
Ožiarená	2–3	5,453	2,984	2,200

folikulov vaječníkov sme po ožiarení zaznamenali signifikantné zníženie hodnôt mitotického indexu.

Podiel folikulárných buniek s pyknotickým jadrom sa po ožiarení signifikantne zvýšil v porovnaní s hodnotou skupiny kontrolných bahníč ($P < 0,01$).

Výsledky mikrometrického sledovania hodnôt plochy folikulu, oocytu a jadra primárných folikulov uvádzame v tab. III. Pri porovná-

vaní hodnôt uvedených častí folikulu vaječníkov ožiarených a neožiarených oviec sme zistili signifikantné zvýšenie plochy oocyty ($P < 0,05$) v skupine folikulov s jednou vrstvou buniek (log 2,438, resp. log 2,707).

DISKUSIA

Ingram (1962) vo svojich prácach porovnal zmeny zárodočných buniek po ožiarení vaječníkov so zmenami prebiehajúcimi počas spontánnej atrézie. Dospel k záveru, že zárodočné bunky folikulov vaječníkov podliehajúce degeneratívnym zmenám účinkom žiarenia vykazujú podobné zmeny ako počas spontánnej atrézie. Charakter priebehu uvedených zmien po ožiarení je však iný ako počas spontánnej atrézie. Na rýchlosť priebehu týchto zmien vplýva predovšetkým dávka, spôsob ožiarenia a vývojové štádium folikulu. Za jednu z najskorších histologicky viditeľných zmien v zárodočných bunkách po ožiarení považuje Baker (1966) zmeny na jadre postihujúce chromozómy, ktoré sa prejavujú ich kondenzáciou a agregáciou. Bezprostredne potom jadro podlieha pyknóze, cytoplazma oocyty sa zakalí a stáva sa eozínofilnou. Posledné spomínané zmeny v cytoplazme pripísal Goldfeder (1967) poškodeniu mitochondrií a membránových systémov cytoplazmy.

Naše výsledky získané kvalitatívnym histologickým sledovaním primárnych folikulov vo vaječníkoch oviec po ožiarení gama lúčmi sú blízke uvedeným zisteniam. Podobne ako citovaní autori sme aj my v oocytoch primárnych folikulov pozorovali degeneratívne zmeny, ktoré v neskoršom období vyúsťovali do ich rozpadu.

Vplyv stupňovaných dávok žiarenia na vaječníky krýs a myši študoval Baker (1966). Zistil, že stupňované dávky žiarenia znižujú celkový počet oocytov v ováriách, čím znižujú fertilizačnú schopnosť. Pri sledovaní celkového účinku žiarenia na deštrukciu oocyty došiel k názoru, že množstvo poškodených oocytov je priamo úmerné dávke žiarenia. Absolútny počet poškodených oocytov vo vaječníkoch môže ovplyvňovať aj doba analýzy po ožiarení a reparatívne mechanizmy vaječníkov. Tieto zistenia neskoršie potvrdil a doplnil Ioannou (1963), ktorý v pokusoch na morčatách a opiciach zistil, že žiarením poškodené oocyty sú v závislosti od stupňa poškodenia eliminované z vaječníka v priebehu jedného až dvoch dní po ožiarení. Uvedené výsledky by mohli čiastočne vysvetľovať naše histologické pozorovania okružných jaderných buniek v priestore poškodeného oocyty ako súčasť reparatívnych procesov. Podobne by bolo možné zdôvodniť aj relatívne nízky počet nepoškodených primárnych folikulov a individuálne rozdiely výskytu poškodenia folikulov vo vaječníkoch oviec zabitých tesne po ukončení ožarovania a desiaty deň po ožiarení.

Braw a Tsafiriri (1980) a neskôr Koering a i. (1982) s úspechom použili metódu sledovania indexu mitózy a pyknózy folikulárnych buniek pre vyjadrenie ich rastu alebo začínajúcej atrézie. Použitím kritérií hodnôt mitotického a pyknotického indexu folikulárnych buniek sme u nepoškodených folikulov zistili po ožiarení zastavenie ich mitotického množenia a nástup atretických zmien. Dosiahnuté výsledky poskytujú ďalšie dôkazy o tom, že oocyty a folikulárne bunky primárnych folikulov citlivo reagujú na protrahované gama žiarenie výraznými histomorfologickými zmenami degeneratívneho charakteru rôzneho stupňa. Oocyt primárneho folikulu s jednou vrstvou buniek sa zdá byť

citlivejší na účinok žiarenia ako oocyt obklopený viacerými vrstvami folikulárnych buniek.

Literatúra

- ARENDARČIK, J. — PRASLIČKA, M. — MOLNÁROVÁ, M. — STANÍKOVÁ, A. — HALAGAN, J.: Zmeny v hypotalamo-hypofyzárnom a ovariálnom systéme oviec po protrahovanom žiarení. In: Súhrny z Celoštátnej rádiobiologickej konferencie, Deštné 1983.
- BAKER, T. G.: The sensitivity of oocytes in post-natal rhesus monkeys to X-radiation. *J. Reprod. Fertil.*, 12, 1966, s. 183-192.
- BLOOM, W. — FAWCET, D. W.: A textbook of histology. W. B. Saunders Comp., Philadelphia, London, Toronto 1969, s. 728-743.
- BRAW, R. H. — TSAFRIRI, A.: Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fertil.*, 59, 1980, s. 267-271.
- GOLDFEDER, A.: The role of mitochondrial integrity in cellular radiosensitivity. *J. Cell Biol.*, 27, 1967, s. 34-36.
- HALAGAN, J. — ARENDARČIK, J. — BALÚN, J. — CHLEBOVSKÝ, O.: Vplyv X-lúčov na endokrinnú funkciu vaječníkov oviec ožiarených v sezóne párenia. *Veter. Med. (Praha)*, 25, 1980, s. 21-28.
- HALAGAN, J. — ARENDARČIK, J.: Zmeny folikulov vaječníkov oviec po ožiarení. In: Súhrny z Celoštátnej rádiobiologickej konferencie, Deštné 1983.
- CHOUDARY, J. B. — GIER, H. T. — MARION, G. B.: Cyclic changes in bovine vesicular follicles. *J. anim. Sci.*, 27, 1968, s. 468-471.
- INGRAM, D. L.: Atresia. In: *The Ovary*. S. Zuckerman ed. Vol. I, 1962.
- IOANOU, J. M.: Radiosensitivity of oocytes in post-natal guinea pigs. *J. Reprod. Fertil.*, 18, 1969, s. 287-295.
- KOERING, M. J. — BAEHLER, A. — GOODMAN, A. L. — HODGEN, G. D.: Developing morphological asymmetry of ovarian follicular maturation in monkeys. *Biol. Reprod.*, 27, 1982, s. 989-997.
- MATSUMOTO, A.: Effects of X-ray irradiation in early postnatal rats on subsequent development of ovaries. *Anat. Zool. Jap.*, 45, 1972, s. 80-87.
- MOLE, R. H. — PAPWORTH, D. G.: The sensitivity of rat oocytes to X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 10, 1966, s. 609-615.
- TOKOŠ, M. — ARENDARČIK, J. — PRASLIČKA, M. — MARAČEK, I. — STANÍKOVÁ, A. — BALÚN, J.: Zmeny vaječníkov oviec po ožiarení X-lúčmi. *Veter. Med. (Praha)*, 25, 1980, s. 91-100.

Došlo dňa 11. 3. 1985

ХАЛАГАН, Ю. — АРЕНДАРЧИК, Й. — МОЛНАРОВА, М. — СТАНИКОВА, А. (Институт ветеринарии, Кошице): Гистоморфологические изменения фолликулярного аппарата яичников у овцематок после облучения. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985 (10): 595-602.

По количественному и микрометрическому методу определяли гистологические изменения первичных фолликулов у овец после 5-дневного продленного облучения-гамма. Опыт проходил в период анэстра на 21 овце словацкий меринос по 3 группам: I (контроль) не облучали; II и III гр. — гамма-лучами ^{60}Co 5 дней общей дозой 4,8 Сг. А всем (и контролю) давали в течение 10 дней после облучения Ампицилин Спота 250 мг на гол./сутки, к тому же III гр. вдобавок и смесь витаминов Роборан Аш: 10 г на гол. сутки. Животных забивали на 5-й день облучения и на 10-й после его прекращения. Обработанные гистологическим методом яичники разрезали на срезы в 7 мкм по серии 70 мкм и окрашивали гематоксилин-эозином. Качественный гистоморфоанализ показал у ооцитов перв. фолликулей агрегирование хроматина, пикноз ядер, ясную ацидофилию цитоплазмы ооцитов, их сжатие и распад. У неповрежденных перв. фолликулей после облучения прекращается митотическое деление фолликулярных клеток и рост этих клеток с пикнотическим ядром. Как показали результаты, упомянутое облучение вызывает заметные дегенеративные изменения в период анэстра. Ни антибиотики, ни витамины заметно не предупреждают гистоморфологические изменения.

первичные фолликулы; облучение; период анэстра

HALAGAN, J. — ARENDARČIK, J. — MOLNÁROVÁ, M. — STANÍKOVÁ, A. (University of Veterinary Medicine, Košice): *Histomorphological Changes in the Follicular Apparatus of Ewes' Ovaries after Irradiation*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 595-602.

Histological changes in primary follicles of ewes after the five-day protracted exposure to gamma rays were studied by qualitative and micrometric methods. The experiment was carried out in the anoestrous period with 21 ewes of the Slovak Merino-breed, divided into three groups. The first control group (five ewes) was not irradiated. The second and third groups (each included eight ewes) were irradiated by gamma rays ^{60}Co during the period of five days by the total dose of 4.8 Gy. All ewes, included the control ones, were given Ampicillin Spofa 250 mg per head/day during the period of ten days after irradiation. The third group was administered, apart from this treatment, a mixture of vitamins Roboran H at the dose of 10 g per head/day. The animals were slaughtered on the fifth day of irradiation and on the tenth day after the end of irradiation. The ovaries, processed by a routine histological method, were cut in 7 μm slices in the series of 70 μm and stained with hematoxylin-eosine. By a qualitative histomorphological analysis of the oocytes of primary follicles chromatin aggregation, pycnosis of nuclei, pronounced acidophilia of oocyte cytoplasm, their shrinking and disintegration were determined. In intact primary follicles, mitotic division of follicular cells stopped and the proportion of follicular cells with pycnotic nuclei increased after irradiation. The results show that the five-day protracted exposure to gamma rays at the total dose of 4.8 Gy causes pronounced degenerative changes in the anoestrous period. Administration of antibiotics or vitamins has no significant effect on the stated histomorphological changes.

primary follicles; radiation; anoestrous period

HALAGAN, J. — ARENDARČIK, J. — MOLNÁROVÁ, M. — STANÍKOVÁ, A. (Veterinärmedizinische Hochschule, Košice): *Histomorphologische Veränderungen des Follikularapparats der Eierstöcke von Mutterschafen nach Bestrahlung*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 595-602.

Aufgrund qualitativer und mikrometrischer Methoden studierten wir histologische Veränderungen der Primärfollikel von Mutterschafen nach fünftägiger protrahierter Bestrahlung mit Gamma-Strahlen. Der Versuch wurde in der anöstrischen Phase mit 21 Schafen der Rasse Slowakisches Merino, die in drei Gruppen eingeteilt waren, vorgenommen. Die erste Kontrollgruppe (5 Schafe) wurde nicht bestrahlt. Die zweite und dritte Gruppe (mit jeweils 8 Schafen) wurde mit Gamma-Strahlen ^{60}Co im Verlauf von fünf Tagen mit einer Gesamtdosis von 4,8 Gy bestrahlt. An alle Mutterschafe, einschl. der Kontrollschafe, wurde während zehn Tagen nach der Bestrahlung Ampicilin Spofa u. zw. 250 mg pro Stück und Tag, verabreicht. Der dritten Gruppe wurde außerdem ein Vitaminkonzentrat u. zw. Roboran H in einer Dosis von 10 g pro Stück und Tag, verabfolgt. Die Tiere wurden am fünften Tag der Bestrahlung und am zehnten Tag nach Beendigung der Bestrahlung geschlachtet. Mittels geäußelter histologischer Methoden bearbeitete Eierstöcke wurden zu 7 μm -Schnitten in 70 μm -Serie geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Durch qualitative histomorphologische Analyse von Oozyten der Primärfollikel stellten wir eine Chromatinaggregation, eine Pyknose der Kerne, eine ausgeprägte Azidophilie des Zytoplasmas der Oozyten sowie deren Schrumpfung und Zerfall fest. Bei den unbeschädigten Primärfollikeln stellten wir nach der Bestrahlung eine Einstellung der mitotischen Teilung der follikulären Zellen und eine Erhöhung des Anteils follikulärer Zellen mit einem pyknotischen Kern fest. Die ermittelten Ergebnisse erwiesen, daß eine fünftägige protrahierte Bestrahlung mit Gamma-Strahlen in einer Gesamtdosis von 4,8 Gy ausgeprägte degenerative Veränderungen in der anöstrischen Periode hervorruft. Eine Verabreichung von Antibiotika oder Vitaminen hat auf die angeführten histomorphologischen Veränderungen keinen Einfluß.

Primärfollikel; Bestrahlung; anöstrische Periode

Adresa autorov:

Doc. MVDr. Juraj Halagan, CSc., prof. MVDr. Jozef Arendarčík, DrSc., ing. Marie Molnárová, CSc., RNDr. Angela Staníková, Vysoká škola veterinárska, Komenského 73, 041 81 Košice

SEROLOGICKÝ DŮKAZ VÝSKYTU AVIÁRNÍCH PARAMYXOVIRŮ U HOLUBŮ

K. Černík, B. Tůmová, B. Kamiňskýj, V. Rajtár

ČERNÍK, K. — TŮMOVÁ, B. — KAMIŇSKÝJ, B. — RAJTÁR, V. (Bioveta, n. p., Nitra; Institut hygieny a epidemiologie, Praha; Ústav štátnej kontroly veterinárnych biopreparátov a liečiv, Nitra): *Sérologický dôkaz výskytu aviárnych paramyxovirů u holubů*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 603-610.

Vyšetřili jsme 447 vzorků krevních sér sportovních a volně žijících holubů, odebraných v 11 okresech ČSSR od srpna 1983 do března 1984, hemaglutinačně inhibičním testem proti viru pseudomoru drůbeže, kmen Roakin, proti holubímu PMV-1 a proti PMV-3. 121 vzorků z nich bylo vyšetřeno proti ostatním sérotypům PMV-2 až PMV-9 a proti aviárnímu viru chřipky A. Proti kmenu Roakin bylo pozitivních ($\geq 2 \log_2$) 58,4 % vzorků s průměrným titrem 3,6 $\log_2$ a proti holubímu PMV-1 bylo pozitivních 65,1 % vzorků s průměrným titrem 4,5 $\log_2$. Všechny vyšetřené vzorky byly negativní proti ostatním sérotypům, kromě dvou vzorků z jedné skupiny vzorků pozitivních proti PMV-8 s průměrným titrem 4,3 $\log_2$. Porovnávali jsme titry hemaglutinačně inhibičních (HI) protilátek proti kmenu Roakin a proti holubímu PMV-1. Diskuse se zabývá nebezpečím přenosu a zpětné adaptace holubího viru na drůbež.

krevní sérum; protilátky; přenos; zpětná adaptace

Vzplanutí paramyxovirové nákazy holubů, která v roce 1983 postihla chovy sportovních holubů i volně žijící holuby v celé Evropě, vyvolalo zvýšený zájem o výskyt různých sérotypů paramyxoviru u holubů. Až do té doby byly z holubů a hrdliček izolovány různé paramyxoviry, které byly zařazeny do třetí a sedmé sérotypové skupiny (Kida a Yanagawa, 1979; Alexander aj., 1981; Gough a Alexander, 1983; Ottis a Bachmann, 1983). U nás bylo v letech 1978 až 1982 na západním Slovensku izolováno z kloakálních výtěrů volně žijících převážně vodních ptáků 41 kmenů paramyxoviru, z toho 25 kmenů PMV-1, 10 kmenů PMV-4 a 6 kmenů PMV-6. Sérotyp PMV-1 byl izolován pravidelně každoročně (Tůmová aj., 1984).

Devět holubích paramyxovirů izolovaných v roce 1983 v Čechách, na Moravě a na Slovensku bylo charakterizováno jako paramyxovirus 1 (virus pseudomoru drůbeže) s patogenitou pro drůbež sniženou na úroveň mezogenních kmenů, přičemž charakteristika termostability infekčnosti těchto virů odpovídala velogenním viscerotropním kmenům (Černík aj., 1985). V mezinárodní srovnávací studii holubích izolátů, zahrnujících 57 kmenů z Evropy, Japonska a Sudanu, se čtyři ze šesti československých izolátů ukázaly jako shodné s ostatními paramyxoviry co do patogenity pro kuřata i podle reakce s monoklonálními

protilátkami, zatímco dva z nich (Bratislava 1 a 2) vykazovaly vyšší patogenitu pro kuřata a významně se lišily i spektrem vázaných monoklonálních protilátek, jímž se podobaly kmenu Ulster 2C viru pseudomoru drůbeže (Alexander aj., 1985).

Důkazy o přenosu paramyxoviru 1 krmivem kontaminovaným trusem holubů na drůbež a jiné ptáky (kachny a pávy) v roce 1984 staví paramyxovirovou infekci holubů do nového světla. Zamoření sportovních a volně žijících holubů paramyxovirem 1 způsobuje, že tento paramyxovirus nabývá nejen na epizootologickém, ale i na hospodářském významu jako možný rezervoár viru pseudomoru, ohrožující produktivitu velkochovů drůbeže. Zároveň vyvstávají nové epizootologické otázky, jejichž řešení není snadné, ale vysoce aktuální. Týkají se především likvidace ohnisek infekce mezi volně žijícími holuby, ochrany skladů krmiva před kontaminací infikovaným trusem holubů a konečně možné reverze holubího paramyxoviru na typ plně virulentní pro drůbež.

Předmětem této práce bylo na základě sérologického průzkumu stanovit stupeň zamoření holubů v ČSSR různými sérotypy paramyxoviru.

MATERIÁL A METODY

V období od srpna 1983 do března 1984 jsme vyšetřili celkem 447 vzorků krevních sér holubů volně žijících a chovaných pro sportovní účely (poštovní holubi a rejdiči), pocházejících z jedenácti okresů, z toho ze tří českých, jednoho moravského a sedmi slovenských. V hejnech volně žijících holubů byli pozorováni klinicky nemocní jedinci. Sportovní holubi pocházeli z oblastí, v nichž se v roce 1983 vyskytla infekce paramyxovirem a většina chovů byla v tomtéž roce očkována živou vakcínou AVIPEST proti pseudomoru drůbeže.

Všechny vzorky jsme vyšetřovali jednotlivě mikrometodou hemaglutinačně inhibičního testu (HIT) proti viru pseudomoru drůbeže, kmen Roakin, proti holubímu paramyxoviru-1, kmen Bratislava 2/83, a proti paramyxoviru sérotypu 3. Část vzorků (121) jsme vyšetřili i proti paramyxovirům ostatních sérotypů (PMV-2 až PMV-9) a proti viru chřipky A. Vzorky byly ředěny dvojnásobně v poměru od 1 : 2 do 1 : 256 pomocí Minidiluteru II (Dynatech) na deskách a testovány proti čtyřem hemaglutinačním jednotkám příslušného antigenu s 0,5 až 10% suspenzí kohoutích erytrocytů. Část sér byla rutinně preparována RDE (Receptor Destroying Enzyme, Sevac). Zjistili jsme však, že většina ptačích sér neobsahuje nespecifické inhibitory vůči virům chřipky a paramyxovirům.

Výsledky byly hodnoceny podle průměrného titru pozitivních vzorků (1 : 4 a více) a průměrného titru všech vyšetřených vzorků, přičemž rozdíl těchto dvou hodnot je ukazatelem podílu pozitivity jednotlivých skupin vzorků. Průměrné hodnoty titrů jsme znázornili graficky. Vztah mezi titry jednotlivých sér proti kmenu Roakin a holubímu izolátu PMV-1 jsme hodnotili testem sekvenční analýzy (Documenta Geigy, 1975).

VÝSLEDKY

Z celého souboru vzorků vyšetřených proti viru pseudomoru (PMV-1) bylo 58,4 % pozitivních proti kmenu Roakin a 65,1 % proti holubímu izolátu PMV-1. Skupiny zcela negativní v HI testu proti těmto virům byly zjištěny v říjnu 1983 a obsahovaly sebrané vzorky sér holubů ze soukromých chovů v oblasti Žiliny a Veličné (Dolný Kubín) a v únoru 1984, kdy byly zjištěny dva negativní, dosud neočkované chovy holubů v Levicích. Výsledky vyšetřování proti kmenu Roakin a holubímu PMV-1 jsou shrnuty v tab. I. Průměrný titr pozitivních vzorků ze všech

I. Procento pozitivních vzorků a průměrné titry sérových HI protilátek v pozitivních vzorcích proti kmenu Roakin a proti holubímu PMV-1 sportovních (S) a volně žijících holubů (V) v jednotlivých skupinách — Percentage of positive samples and the mean titres of serum HI antibodies in positive samples to the Roakin strain and to the pigeon PMV-1 of racing (S) and free living pigeons (L) in individual groups

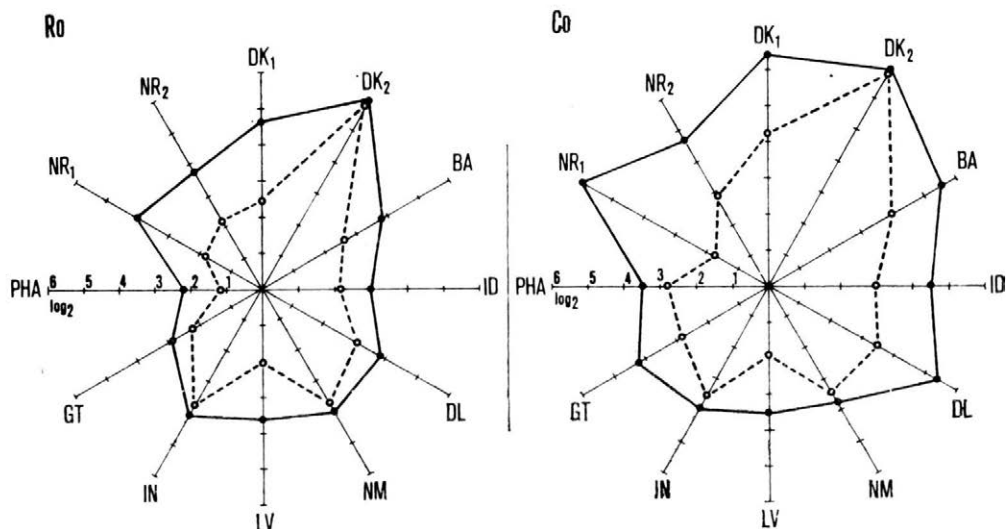
Lokalita	Doba odběru	Typ	Počet	Kmen Roakin		Holubí PMV-1	
				procento pozitivních	Ø titr log ₂	pozitivní	Ø titr log ₂
České Budějovice	7/83	S	2	100	5,50	100	6,00
Nitra	8/83	S	4	100	4,25	100	6,00
Zlaté Moravce	8/83	S	1	+	8,00	+	8,00
Dolný Kubín (DK ₁)	8/83	S	49	51,0	4,64	64,6	6,42
Dolný Kubín (DK ₂)	9/83	S	48	95,8	6,00	97,9	6,91
Ústí nad Orlicí	9/83	S	1	0	0	0	0
Nitra (NR ₁)	9/83	V	84	46,4	3,95	28,2	5,92
Nitra	10/83	V	20	75,0	4,77	—	—
Žilina	10/83	S	27	0	0	0	0
Veličná	10/83	S	34	0	0	0	0
Bratislava (BA)	11/83	V	10	60,0	3,83	67,0	5,50
Ivanka pri D. (ID)	11/83	S	6	67,0	3,00	67,0	4,50
Dunajská Lužná (DL)	11/83	S	5	80,0	3,75	60,0	5,33
Nitra (NR ₂)	2/84	V	42	57,2	3,71	61,9	4,58
Nové Mesto nad Váhom (NM)	2/84	S	29	93,1	3,93	89,7	3,73
Levice (LV)	2/84	S	28	60,7	3,41	53,6	3,47
Ivanka pri N. (IN)	2/84	S	35	93,3	3,97	91,4	3,88
Gottwaldov (GT)	3/84	S	9	78,0	2,86	67,0	4,17
Praha (PHA)	3/84	S	13	54,0	2,14	77,0	3,60
			447	58,4	3,60	65,1	4,48

vyšetřených skupin byl 3,6 log₂ (1 : 12) proti kmenu Roakin a 4,5 log₂ (1 : 22) proti holubímu viru.

Všechny vyšetřené vzorky holubích sér byly negativní v HI testu proti PMV-3. Proti ostatním sérotypům paramyxoviru a proti viru chřipky A byly vyšetřeny s negativními výsledky skupiny vzorků odebraných od poštovních holubů ze Žiliny a Veličné a od volně žijících holubů z města Nitra, ale ze skupiny NR₂ byly dva vzorky (5,6 %) pozitivní proti PMV-8 s průměrným titrem 4,3 log₂ (1 : 19,5).

Kolísání jednotlivých titrů ve skupině bylo značné a podobně i kolísání průměrných titrů mezi skupinami, z nichž 12 je znázorněno na obr. 1, kde se porovnávají průměrné titry pozitivních a všech vyšetřených vzorků v jednotlivých skupinách proti kmenu Roakin (Ro) a proti

holubímu PMV-1 (Co). Podle výsledků sekvenční analýzy byly v devíti ze dvanácti uvedených případů titry proti holubímu PMV-1 významně vyšší, ve třech případech (IN, LV, NM) byly naopak vyšší titry proti kmenu Roakin, rozdíl však nebyl signifikantní.



1. Průměrné titry HI protilátek proti kmenu Roakin (Ro) a holubímu PMV-1 (Co) ve vzorcích sér holubů ze 12 vyšetřených skupin, označených podle tab. I (průměrné titry pozitivních vzorků — plné body a plná čára; průměrné titry všech vyšetřených vzorků — prázdné body a přerušovaná čára) — Mean titres of HI antibodies to the Roakin strain (Ro) and to the pigeon PMV-1 (Co) in the blood-serum samples of pigeons in 12 tested groups identified according to Tab. I (mean titres of positive samples — full points and full line; mean titres of all samples tested — empty points and broken line)

DISKUSE

Ve všech vyšetřených skupinách holubů jsme zjistili vyšší procento pozitivních vzorků i celkový průměrný titer HI protilátek proti holubímu PMV-1 než proti kmenu Roakin, kromě těch případů (IN, LV, NM), kdy šlo o skupiny aktuálně imunizované živou vakcínou AVIPEST z kmene La Sota. Tento jev svědčí o určitém stupni antigenní odlišnosti holubích a drůbežích kmenů PMV-1 i o nestejně imunitní reaktivnosti organismu holubů na tyto kmeny. Alexander aj. (1984) dospěli k podobným výsledkům a rozšířili toto pozorování i na imunitní odpověď kuřat vůči holubímu viru. Zjistili, že v testu inhibice hemaglutinace nejsou prokazatelné rozdíly mezi holubími kmeny izolovanými ve Velké Británii, v Belgii, Německé spolkové republice a v Dánsku. Výrazné rozdíly v titrech HI protilátek však zaznamenali mezi kmeny pseudomoru MC 110 (izolovaný z husice liščí), kmenem F a holubími izoláty při použití drůbežního antiséra získaného v terénu. Vzájemný poměr titrů HI protilátek proti drůbežímu a holubímu paramyxoviru svědčí tedy buď o přirozené infekci holubím virem (v případě vyšší reakce proti holubímu viru), nebo o očkování vakcínou obsahující drůbeží virus (v případě vyššího titru proti tomuto viru). Pozorované rozdíly opět potvrzují

určitou antigenní odlišností obou typů viru. Tyto vztahy byly zaznamenány i během pokusného ověřování účinnosti inaktivované vakcíny proti paramyxovirové nákaze holubů COLINAK (Černík aj., 1984).

V rámci retrospektivního průzkumu vyšetřili Kaleta a Heffelsová (1982) 1257 vzorků krevních sér poštovních holubů z oblasti Německé spolkové republiky hemaglutinačně inhibičním testem proti aviárním paramyxovirům sérotypů 1, 2 a 3 a ani v jednom případě nezjistili protilátky proti viru pseudomoru (PMV-1). Zhruba čtvrtina ze 465 vzorků sér odebraných v letech 1979 až 1980 vykazovala protilátky proti PMV-2 (Yucaipa), přičemž ve dvou případech bylo dosaženo titru 1 : 256. Čtvrtina těchto vzorků byla pozitivní i proti PMV-3, ale titry protilátek byly nižší než proti PMV-2, nejvyšší titr byl 1 : 64. Skutečnost, že ani v jednom z vyšetřených vzorků holubích sér nebyly nalezeny protilátky proti viru pseudomoru (PMV-1), hodnotili Heffelsová aj. (1981) tak, že této infekci u holubů není třeba připisovat významnou úlohu. Autoři však zdůraznili, že v době odběru vzorků (1976—1979) nebylo pozorováno vzplanutí pseudomoru ani v chovech drůbeže, a proto nelze posuzovat podíl holubů na přenosu infekce.

V období od května do října 1983 však zjistili Broos a Singer (1984) v severním Bavorsku vysoké titry HI protilátek proti holubímu PMV-1 (1 : 256—512) u holubů, u nichž se vedle vodnatých průjmů a typických změn na mozku pozorovala lymfohistiocytární infiltrace ledvin, popřípadě jater. U mnoha podezřelých holubů byla prokázána endoparazitóza a salmonelóza, ale infekce PMV-1 nebyla potvrzena ani izolací viru, ani sérologicky. U nás ve stejném období (podle osobního sdělení — Časnochová, 1983) bylo z 24 klinicky nemocných holubů, pocházejících ze Středoslovenského kraje a vyšetřených HI testem proti drůbežímu viru pseudomoru, 87,5 % pozitivních a průměrný titr byl $7,5 \log_2$ (1 : 175). Čtyři holubi z Prešova byli vyšetřeni s pozitivními výsledky a průměrným titrem $5,6 \log_2$ (1 : 47).

Pochybnosti o přenosu PMV-1 z holubů na drůbež byly konečně zcela nepochybně rozptýleny úřední zprávou ministerstva zemědělství a výživy a hlavního veterinárního lékaře Velké Británie z března roku 1984. V této zprávě se uvádí, že krmivo uskladněné v přístavních skladističích v Liverpoolu a kontaminované trusem divokých holubů infikovaných PMV-1 je prokazatelně příčinou vzplanutí pseudomoru drůbeže, k němuž došlo koncem února a v březnu 1984 (Anon., 1984a, b, c, d). Do konce března bylo potvrzeno osm ohnisek infekce a poraženo bylo 390 000 kusů drůbeže. Pod tlakem pojišťoven, hradících škody vzniklé likvidací infikované drůbeže, bylo ve Velké Británii znovu zavedeno očkování drůbeže proti pseudomoru inaktivovanými vakcínami a živou vakcínou z kmene B1. Vyvolávající virus je podle laboratorního vyšetřování identický s paramyxovirem, který v předcházejících devíti měsících vyvolával onemocnění holubů. Infekce drůbeže měla viscerotropní povahu, virus se vylučoval trusem, a proto se horizontálně šířil pomaleji než pneumotropní virus, postihující dýchací trakt. O tom, že vstupní branou infekce je zažívací trakt, svědčí i skutečnost, že pseudomor vzplanul v chovu brojlerů proti pseudomoru už očkovaných. Dosavadní zkušenosti s přirozeným přenosem holubího viru na drůbež jsou dalším dokladem názoru, že současný holubí paramyxovirus se selektoval z velogenního viscerotropního kmene viru pseudomoru tím, že se během de-

seti let od světové panzoocie začátkem sedmdesátých let postupně adaptoval na holuby [ČERNÍK aj., 1983]. Jeho patogenita pro drůbež se snížila na úroveň mezogenních kmenů, ale viscerotropní povaha zůstala zachována. Dá se důvodně předpokládat, že proces readaptace viru z holubů na drůbež byl zahájen.

Pozornost si zaslouhuje i průkaz protilátek vůči PMV-8, který byl zatím izolován pouze na východě Spojených států amerických z husy bernešky velké (*Branta canadensis*) a v Japonsku z ostralky štíhlé (*Anas acuta*) [Cloud a Rosenberger, 1980; Yamana aj., 1982]. Lze předpokládat, že rozšíření tohoto i dalších sérotypů paramyxoviru je zřejmě větší, než naznačují dosavadní výsledky sledování.

Literatura

- ALEXANDER, D. J. — HINSHAW, V. S. — COLLINS, M. S.: Characterization of viruses from doves representing a new serotype of avian paramyxoviruses. *Arch. Virol.*, 68, 1981, č. 3-4, s. 265-269.
- ALEXANDER, D. J. — RUSSELL, P. H. — COLLINS, M. S.: Paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons. 1. Characterisation of isolated viruses. *Veter. Rec.* 114, 1984, č. 18, s. 444-446.
- ALEXANDER, D. J. — RUSSELL, P. H. — PARSONS, G. aj.: Antigenic and biological characterization of avian paramyxovirus type 1 - isolates from pigeons — an international collaborative study. *Avian Path.*, 14, 1985, s. 365-376.
- ANON.: Animal health: Newcastle disease. Outbreaks linked to pigeons. *Veter. Rec.*, 114, 1984a, č. 13, s. 305-306.
- ANON.: Animal health: Paramyxovirus in peacocks. *Veter. Rec.*, 114, 1984b, č. 21, s. 507.
- ANON.: Animal health: Poultry industry withdraws support for ND slaughter policy. *Veter. Rec.*, 114, 1984c, č. 26, s. 627.
- ANON.: Animal health: Newcastle disease vaccination — MAFF statement. *Veter. Rec.*, 115, 1984d, č. 5, s. 93-94.
- BROOS, H. W. — SINGER, H.: Untersuchungen für das Austreten der Paramyxovirusinfektion in Taubenbeständen Nordbayerns. *Tierärztl. Umsch.*, 39, 1984, č. 7, s. 557-560.
- CLOUD, S. S. — ROSENBERGER, J. K.: Characterization of nine avian paramyxoviruses. *Avian Dis.*, 24, 1980, č. 1, s. 139-152.
- ČERNÍK, K. — KAMIŇSKÝJ, B. — RAJTÁR, V.: Inaktivovaná olejová vakcína COLINAK proti paramyxovirové nákaze holubů. *Imunoprofylaxia*, 1984, č. 4, s. 6-20.
- ČERNÍK, K. — MARJÁNKOVÁ, K. — DVOŘÁKOVÁ, D. aj.: Paramyxovirová infekce holubů. *Imunoprofylaxia*, 1983, č. 4, s. 26-44.
- ČERNÍK, K. — TÚMOVÁ, B. — NOVOTNÁ, L. aj.: Charakteristika holubích paramyxovirů izolovaných v ČSSR. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985, č. 2, s. 109-123.
- DOCUMENTA GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen. 7. vyd. Stuttgart, G. Thieme Verlag 1975, s. 197.
- GOUGH, R. E. — ALEXANDER, D. J.: Isolation and preliminary characterisation of a paramyxovirus from collared doves (*Streptopelia decaocto*). *Avian Path.*, 12, 1983, č. 1, s. 125-134.
- HEFFELS, U. — FRITZSCHE, K. — KALETA, E. F. aj.: Serologische Untersuchungen zum Nachweis virusbedingter Infektionen bei der Taube in der Bundesrepublik Deutschland. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 88, 1981, č. 3, s. 97-102.
- KALETA, E. F. — HEFFELS, U.: Zum serologischen Nachweis des Paramyxovirus-1, -2 und -3 bei Tauben. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 89, 1982, č. 1, s. 31-32.
- KIDA, H. — YANAGAWA, R.: Isolation of a new avian paramyxovirus from a rock pigeon (*Columba livia*). *Zbl. Bakt., I. Orig., A*, 245, 1979, č. 4, s. 421-428.
- OTTIS, K. — BACHMANN, P. A.: Isolation and characterization of ortho-myxo-

viruses and paramyxoviruses from fetal birds in Europe. Zbl. Veter.-Med., R. B., 30, 1983, č. 1, s. 22-35.

TŮMOVÁ, B. — TUREK, R. — KUBÍNOVÁ, I. aj.: Výskyt paramyxovirů u volně žijících ptáků v letech 1978-1982. Acta virol., 28, 1984, č. 2, s. 114-121.

YAMANE, N. — ARIKAWA, J. — ISHIDA, N.: Characterization of avian paramyxoviruses isolated from feral ducks in northern Japan: The presence of three distinct viruses in nature. Microbiol. Immunol., 26, 1982, č. 7, s. 557-568.

Došlo dne 17. 1. 1985

ЧЕРНИК, К. — ТУМОВА, Б. — КАМИНСКИЙ, Б. — РАЙТАР, В. (Биовета, нац. пр. Нитра; Институт гигиены и эпидемиологии, Прага; Институт госконтроля ветеринарных биопрепаратов и лекарств, Нитра): Серологическое доказательство наличия авиарных парамиксовирусов у голубей. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 603-610.

Исследовали 447 проб кровяных сывороток у спортивных и диких голубей из 11 районов ЧССР в период август 83—март 84 с помощью гемагглютинационно-ингибирующего теста против вируса псевдоочумы птицы, штамм Roakin, против голубинового PMV-1 и PMV-3. Из них 121 пробу исследовали на остальные серотипы PMV-2 до PMV-9, а также против авиарного вируса гриппа А. На Roakin-штамм положительных ($\geq 2 \log_2$) было 58,4% проб со средним титром 3,6 $\log_2$, а на голубинового PMV-1 — 65,1% со средним титром 4,5 $\log_2$. Все исследованные пробы оказались отрицательными к остальным серотипам, за искл. 2 образцов одной группы положительных к PMV-8 проб со средним титром 4,3 $\log_2$. Мы сравнивали титры гемагглютинационно-ингибирующих (HI) антител против штамма Roakin и против голубинового PMV-1. В дискуссии приводится опасность передачи и обратной адаптации голубинового вируса на птице.

сыворотка крови; антитела; передача; обратная адаптация

ČERNÍK, K. — TŮMOVÁ, B. — KAMIŇSKÝJ, B. — RAJTÁR, V.: (Bioveta, national enterprise, Nitra; Institute of Hygiene and Epidemiology, Praha; State Control Institute of Veterinary Biopreparations and Drugs, Nitra): *Serological Demonstration of the Prevalence of Avian Paramyxoviruses in Pigeons*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 603-610.

447 blood-serum samples of racing and free living pigeons collected in 11 districts of Czechoslovakia from August 1983 till March 1984 were examined by the haemagglutination inhibition test to the Newcastle disease virus, strain Roakin, to the pigeon PMV-1 and to the PMV-3; 121 of the samples were tested to other serotypes, PMV-2 — PMV-9, and to the avian influenza A virus. 58.4% of samples were positive ($\geq 2 \log_2$) to the Roakin strain with the mean titre 3.6 $\log_2$ and 65.1% to the pigeon PMV-1 with the mean titre 4.5 $\log_2$. All samples tested were negative to other serotypes except two samples of one group positive to PMV-8 with the mean titre 4.3 $\log_2$. The titres of HI antibodies to the Roakin strain and to the pigeon PMV-1 were compared. The risk of the transmission and of the readaptation of pigeon virus to poultry was discussed.

blood serum; antibodies; transmission; readaptation

ČERNÍK, K. — TŮMOVÁ, B. — KAMIŇSKÝJ, B. — RAJTÁR, V. (Bioveta, Volkseigener Betrieb, Nitra; Institut für Hygiene u. Epidemiologie, Praha; Institut für staatliche Kontrolle von Veterinärbiopreparaten und -medikamenten, Nitra): *Serologischer Nachweis des Auftretens aviärer Paramyxoviren bei Tauben*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 603-610.

Wir untersuchten 447 Blutersumproben von Brief- und freilebenden Tauben, die in 11 Kreisen der ČSSR zwischen August 1983 und März 1984 entnommen wurden, mit Hilfe des Hämagglutinationshemmungstestes gegen das Geflügelpseudopestvirus, Stamm Roakin, gegen das Tauben-Paramyxovirus-1 (PMV-1) und gegen das Paramyxovirus-3 (PMV-3). Darunter wurden 121 Proben auch gegen die übrigen Serotypen PMV-2 bis PMV-9 und gegen das aviäre Influenza-A-Virus untersucht. Gegen

den Roakin-Stamm waren 58,4 % der Proben positiv ($\geq 2 \log_2$), mit einem Mittel-titer von 3,6 $\log_2$ und gegen das Tauben-PMV-1 waren 65,1 % der Proben positiv, mit einem mittleren Titer von 4,5 $\log_2$. Alle untersuchten Proben waren gegen alle anderen Serotypen negativ, mit Ausnahme zweier Proben aus einer Gruppe von gegen PMV-8 positiven Proben mit mittlerem Titer 4,3 $\log_2$. Wir verglichen die Titer der Hämagglutinationshemmungs- (HI-) Antikörper gegen den Stamm Roakin und gegen das Tauben-PMV-1. In der Diskussion befassen wir uns mit der Gefahr der Übertragung und der Rückadaptation des Tauben-Virus auf Geflügel.

Blutserum; Antikörper; Übertragung; Rückadaptation

Adresy autorů:

MVDr. Karel Černík, CSc., Bioveta, 949 91 Nitra

MUDr. Běla Tůmová, DrSc., Institut hygieny a epidemiologie, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

MVDr. Bohdan Kamiňskýj, MVDr. Vojtech Rajtár, CSc., Ústav štátnej kontroly veterinárnych biopreparátov a liečiv, Biovetská ul., 949 91 Nitra

VÝVOJ MORFOLOGICKÝCH ZMĚN A PROTILÁTKOVÉ ODEZVY MORČAT EXPERIMENTÁLNĚ INFIKOVANÝCH BAKTÉRIEMI *BRUCELLA SUIIS*, BIOTYP 2

F. Štěrba, L. Zámek, M. Halačková, V. Kraelíková

ŠTĚRBA, F. — ZÁMEK, L. — HALAČKOVÁ, M. — KRAELÍKOVÁ, V. (Státní veterinární ústav, Jihlava): *Vývoj morfolologických změn a protitlátkové odezvy morčat experimentálně infikovaných baktériemi Brucella suis, biotyp 2*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 611-628.

Vaginálně, perorálně, intranazálně, konjunktiválně a subkutánně jsme infikovali 62 morčata baktériemi *B. suis*, biotyp 2. Inokulum obsahovalo $13,8 \cdot 10^9$ brucel v 1 ml fyziologického roztoku. U subkutánní nákazy trvala infekce 151 den, u ostatních infekcí 56 dní. Všemi způsoby byly vyvolány brucelózní změny, které se vyvíjely v závislosti na způsobu a délce infekce. Nejmeně výrazné změny se vytvořily po perorální naze. Brucelóza probíhala chronicky a změny jsme konstantně zjišťovali v játrech, slezině, plicích a po subkutánní infekci i v regionálních mízních uzlinách. Mikroskopickou podstatou změn byl histiocytární granulom. V patogenezi brucelózního procesu v organismu morčat má prioritní význam hematogenní propagace. Nejvyšší sérologická reaktivita byla po subkutánní infekci, nejnižší po infekci perorální. V průběhu jednotlivých způsobů infekcí titry aglutinačních a komplementfixačních protilátek kolísaly a nejvyšší byly od 21. do 56. dne. Ověřovali jsme také diagnostickou účinnost povrchově fixačního testu a nezjistili jsme snížení jeho citlivosti ani v chronické fázi infekce. Zjistili jsme neúplnou korelaci mezi morfolologickými změnami a sérologickou reaktivitou morčat. Největší počet případů brucelózních infekcí byl zjištěn histopatologickým vyšetřením, kterým byla odhalena již iniciální stadia granulomů v době, kdy sérologickým vyšetřením ještě nebyly specifické protilátky zjištěny.

vaginální, perorální, intranazální, konjunktivální a subkutánní infekce; brucelózní změny; patologická morfologie; sérologická reaktivita; dynamika titrů protilátek

Otázkou experimentální infekce morčat baktériemi *Brucella abortus* se poprvé zabývali Smith a Fabyan (1912, cit. Nikolov, 1973), později Jaffe (1932), Nieberle a Palaske (1934, cit. Nikolov, 1973).

Morfolologickými změnami morčat subkutánně infikovaných baktériemi *Brucella suis* se zabývali Černyševová (1952, cit. Žovanik, 1955), Godglück (1952), Žovanik (1955), Kersten (1955), Juskovec (1955), Gelev (1956, cit. Nikolov, 1973), Čilev a Milanov (1959, cit. Nikolov, 1973), Toškov a. (1965, cit. Nikolov, 1973) a Nikolov (1973). U nás sledoval morfolologické změny u morčat infikovaných baktériemi *Brucella suis*, biotyp 2 — subkutánně, vaginálně, perorálně, intranazálně a konjunktiválně Štěrba (1983, 1984). Morfolologické změny morčat infikovaných subkutánně a intrakutánně baktériemi *B. suis* uvádí Ryžkovová (1974).

O patogenezi brucelózního procesu v organismu morčat podrobně referují Očkur (1944, cit. Žovanik, 1955), Plotnikov (1954, cit. Žovanik, 1955), Zdrodovskij (1953), Juskovec (1955) a Žovanik (1955).

Sérologickými, imunologickými a bakteriologickými aspekty experimentálně vyvolané brucelózy morčat se obšírně zabývali Zdrodovskij (1953), Jusko-vec (1955) a Žovanik (1955).

Vzájemný vztah mezi morfológickými změnami a dynamikou titru protilátek u brucelózy morčat, způsobené pokusnou infekcí baktériemi *Brucella suis*, biotyp 2, sledoval Nikolov (1973).

V práci jsme zjišťovali vývoj a šíření brucelózního procesu v organismu morčat při různých způsobech infekce baktériemi *Brucella suis*, biotyp 2, a jejich sérologickou reaktivitu. Dále jsme sledovali korelaci mezi morfológickými změnami a protilátkovou odezvou, a to v závislosti na délce trvání infekce.

MATERIÁL A METODY

Infikovali jsme 62 pohlavně dospělá morčata (38 samců a 24 samice) typizovaným kmenem *Brucella suis*, biotyp 2, ověřeným v referenčním centru Weybridge. Inokulum obsahovalo $13,8 \cdot 10^9$ brucel v 1 ml fyziologického roztoku. Podle způsobu infekce byla morčata rozdělena do pěti skupin.

V první skupině (I) jsme infikovali osm samic vaginálně. Sterilním vatovým tampónem jsme nasákli množství 1 ml suspenze brucel ve fyziologickém roztoku. Tampón jsme zavedli do poševní předsíně, kde jsme kulturu baktérií nanесли na sliznici. Ve druhé skupině (II) jsme infikovali osm samců perorálně tak, že jsme každému podali sondou do žaludku 1 ml suspenze brucel ve fyziologickém roztoku. Ve třetí skupině (III) jsme infikovali osm samců intranazálně. Sterilní vatový tampón s 1 ml suspenze brucel ve fyziologickém roztoku jsme zavedli do levého nosního otvoru do dutiny nosní, kde jsme kulturu baktérií nanесли na sliznici. Ve čtvrté skupině (IV) jsme infikovali osm samců konjunktiválně. Sterilní vatový tampón s 1 ml suspenze brucel ve fyziologickém roztoku jsme zavedli do levého spojivkového vaku, kde jsme kulturu baktérií nanесли na sliznici. V páté skupině (V) jsme infikovali 14 samců a 16 samic subkutánně. Každému morčeti jsme do podkoží v krajině levé předkolenní řasy injekčně aplikovali 1 ml suspenze brucel ve fyziologickém roztoku. Kontrolní skupinu tvořilo 21 neinfikovaných morčat.

Jednotlivé skupiny morčat (I—V) byly podle způsobu infekce ustájeny odděleně v boxech. Odděleně byla ustájena i kontrolní skupina. Ke krmení jsme použili granulě pro morčata a seno *ad libitum* a k napájení čerstvou vodou, která byla každý den v napáječkách vyměňována.

Před infekcí jsme morčata sérologicky vyšetřili na brucelózu metodou rychlé aglutinace RA (ze séra), pomalé aglutinace — PA, reakce vazby komplementu — RVK a povrchové fixačním testem — PFT podle Casteneda v modifikaci Johna aj. (1964).

Pokus trval u subkutánní infekce 151 den, u ostatních způsobů infekcí 56 dní. Z první až čtvrté skupiny infikovaných morčat a z kontrolní skupiny jsme 7., 15., 21., 28., 35., 42., 49. a 56. den po infekci (dále jen p. i.) vykřvili intrakardiální punkcí vždy jedno morče. V páté skupině jsme 7., 14., 21., 28., 35., 41., 49., 56., 66., 94., 117. a 151. den p. i. vykřvili obdobným způsobem jedno až tři morčata a dále jedno morče kontrolní.

Ve všech případech jsme krev vyšetřovali sérologicky se zaměřením na průkaz a dynamiku titru protilátek proti antigenu *B. suis* metodou RA (ze séra), PA, RVK a PFT, tj. obdobným způsobem jako před infekcí.

Každé morče jsme vyšetřili patologicko-morfológicky. Vyšetření bylo zaměřeno na studium vývoje a šíření brucelózního procesu v organismu infikovaných morčat. Dlouhodobě jsme sledovali vývoj změn po subkutánní infekci. Histologicky jsme vyšetřovali plíce, játra, slezinu, ledviny, pohlavní orgány a mizní uzliny. Materiál jsme fixovali bezprostředně po utrácení v 10% neutrálním formolu nebo v Bodianioho fixační tekutině a zpracovali běžnými histologickými postupy. Histologické preparáty byly barveny haematoxylin-eozinem, podle Van Giesona a Sudanem III. Metody podle Kossy jsme použili k průkazu kalcifikací ve změnách.

Orgány morčat jsme souběžně vyšetřili i bakteriologicky. Ke kultivaci jsme použili baktotryptózový agar, baktotryptózový agar s 5 až 10% beraní krví, 5% krevní agar a Endův agar. Plotny byly po kultivaci inkubovány při teplotě 37 °C ve vlhké komůrce po dobu dvou až pěti dní. Nárůst byl posuzován vždy po 24 hodinách inkubace po dobu pěti dní. Při nárůstu drobných bělavých kolonií na krevním

agaru a drobných průhledných kolonií s namodralým leskem na baktotryptózovém agaru jsme zhotovili preparát, který jsme obarvili podle Gramma a udělali sklíčkovou aglutinaci s ředěným králičím antibrucelovým sérem. Z biochemických testů jsme sledovali tvorbu H_2S , ureázovou aktivitu, růst na půdách s bázičným fuchsinem při koncentraci 1 : 50 000 a 1 : 100 000 a růst na půdách s thioninem při koncentraci 1 : 25 000, 1 : 50 000 a 1 : 100 000. Jako pomocné metody jsme použili zhotovení otiskových preparátů barvených podle Gramma a Stamp-Mitcherlicha.

Veškeré laboratorní vyšetřování vycházelo ze standardních Veterinárních laboratorních vyšetřovacích metodik.

VÝSLEDKY

RYŠETŘENÍ MORČAT PŘED INFEKČÍ

Sérologické ryšetření všech morčat metodami RA, PA, RRV, PFT bylo na brucelózu negativní.

RYŠETŘENÍ MORČAT V PRŮBĚHU INFEKCE

Sérologické ryšetření

Výsledky byly hodnoceny analogicky s posuzováním sérologických reakcí při brucelóze prasat v chovech zamořených brucelózou, neboť pro hodnocení sérologických reakcí při brucelóze morčat není ve Veterinárních laboratorních vyšetřovacích metodikách stanovena výše pozitivního titru.

Výsledky jsou uvedeny v tab. I a II. Po subkutánní infekci (tab. II) jsme zjistili metodou RA, PA a PFT pozitivní reakce sedmý den *p. i.*, metodou RVK 28. den *p. i.* Po intranazální a konjunktivální infekci bylo sérologické ryšetření všemi metodami pozitivní 21. den, po vaginální infekci 28. den a po perorální infekci pouze 35. den (tab. I).

Dynamika titrů aglutinačních protilátek infikovaných morčat ve skupinách I až IV je vyjádřena na obr. 1 a dynamika titrů komplementfixačních protilátek na obr. 2. Dynamika titrů aglutinačních a komplementfixačních protilátek morčat infikovaných subkutánně (skupina V) je zobrazena na obr. 3.

U morčat ve skupinách I až IV byly nejvyšší titry aglutinačních protilátek zjištěny po vaginální infekci. Nejnížší titry byly u morčat infikovaných perorálně (obr. 1). Nejvyšší titr komplementfixačních protilátek byl po intranazální infekci (35. den), průměrný největší titr těchto protilátek byl po vaginální infekci a nejnížší titr vykazovala perorální infekce (obr. 2).

U morčat infikovaných subkutánně (skupina V) byl nárůst aglutinačních protilátek rychlejší a výraznější než u morčat ve skupinách I až IV. Nejvyšší titry komplementfixačních protilátek byly v krvi infikovaných morčat od 28. do 41. dne, ale ještě 151. den byla jejich hladina poměrně vysoká (obr. 3).

Bakteriologické ryšetření

Výsledky bakteriologického ryšetření jsou uvedeny v tab. I a II. Brucely byly izolovány z plic, jater a sleziny morčat sedmý až 21. den *p. i.* (skupina I—IV) a sedmý až 28. den *p. i.* (skupina V). Dále byly

I. Výsledky sérologického a bakteriologického vyšetření morčat — skupina I až IV — The results of serological and bacteriological examinations of guinea pigs — group I to IV

Den odběru materiálu <i>p. i.</i>	Číslo morčete	Vaginální infekce I					Perorální infekce II					Intranazální infekce III					Konjunktivální infekce IV				
		sérologické vyšetření				BV	sérologické vyšetření				BV	sérologické vyšetření				BV	sérologické vyšetření				BV
		RA	PA	PFT	RVK		RA	PA	PFT	RVK		RA	PA	PFT	RVK		RA	PA	PFT	RVK	
7.	1	—	—	—	×	+	—	—	—	×	+	—	—	—	×	+	—	—	—	×	+
15.	2	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	×	+	—	1 : 10 +++	—	×	+
21.	3	—	—	—	—	+	+	1 : 10 ++++	±	0	+	+	1 : 20 +++	+	1 : 40 ++++	+	+	1 : 20 ++++	±	1 : 80 ++++	+
28.	4	+	1 : 80 +++	+	1 : 20 ++++	—	—	—	—	—	—	+	1 : 40 +++	+	1 : 5 ++	—	+	1 : 10 ++++	+	1 : 5 ++++	—
35.	5	+	1 : 40 +++	+	1 : 40 ++++	—	+	1 : 40 ++++	+	1 : 40 +++	—	+	1 : 40 ++++	+	1 : 160 ++++	—	+	—	±	×	—
42.	6	+	1 : 320 +++	+	1 : 80 ++++	—	—	—	—	—	—	+	1 : 10 ++++	±	1 : 80 ++++	—	+	1 : 20 ++++	±	1 : 10 ++++	—
49.	7	+	1 : 80 ++++	+	1 : 40 ++++	—	—	—	—	×	+	0	0	0	0	—	+	1 : 40 +++	+	×	+
56.	8	+	1 : 80 +++	+	1 : 80 ++++	—	—	—	—	—	—	+	1 : 20 ++++	+	1 : 80 ++++	—	—	—	—	1 : 20 ++++	—

RA — rychlá aglutinace; PA — pomalá aglutinace; PFT — povrchově fixační test; RVK — reakce vazby komplementu
reakce: + pozitivní; — negativní; ± dubiální; × antikomplementarita séra; 0 nehodnoceno (hemolýza)
BV — bakteriologické vyšetření

II. Výsledky sérologického a bakteriologického vyšetření morčat skupiny V (subkutánní infekce) — The results of serological and bacteriological examination of guinea pigs — group V (subcutaneous infection)

Den odběru materiálu po infekci	Číslo morčete	Sérologické vyšetření				Bakteriologické vyšetření
		RA	PA	PFT	RVK	
7.	1	0	0	0	0	+
	2	+	1 : 40 +++	+	×	+
14.	3	+	1 : 10 ++++	+	—	+
	4	+	1 : 40 ++++	+	×	+
21.	5	+	1 : 160 ++++	+	1 : 5 +++	+
	6	+	1 : 160 ++++	+	—	+
28.	7	+	1 : 40 ++++	+	1 : 1280 ++++	+
	8	+	1 : 40 ++++	+	1 : 40 ++++	+
35.	9	+	1 : 320 ++++	+	1 : 1280 ++++	—
41.	10	+	1 : 160 ++++	+	1 : 2560 ++++	—
49.	11	+	1 : 20 ++++	+	1 : 20 ++++	+
56.	12	+	1 : 320 ++++	+	1 : 640 ++++	—
	13	0	0	0	0	—
66.	14	+	1 : 20 ++++	+	1 : 40 ++++	—
94.	15	0	0	0	0	—
	16	+	1 : 20 ++++	+	1 : 80 ++++	—
	17	0	0	0	0	—

Den odběru materiálu po infekci	Číslo morčete	Sérologické vyšetření				Bakteriologické vyšetření
		RA	PA	PFT	RVK	
94.	18	+	1 : 20 ++++	+	1 : 80 +++	—
117.	19	±	1 : 10 +++	±	1 : 5 +++	—
	20	—	—	±	1 : 5 ++++	—
	21	±	—	±	1 : 20 ++++	—
	22	±	—	±	1 : 20 +++	—
	23	+	1 : 20 ++++	+	1 : 160 ++++	—
	24	±	—	±	1 : 20 +++	—
	25	+	1 : 10 ++++	+	1 : 160 ++++	—
151.	26	+	1 : 10 ++++	+	1 : 80 ++++	—
	27	+	1 : 10 ++++	+	1 : 20 ++++	—
	28	—	—	—	1 : 5 ++++	—
	29	+	1 : 10 ++++	+	1 : 40 ++++	—
	30	+	1 : 20 ++++	+	1 : 40 ++++	—

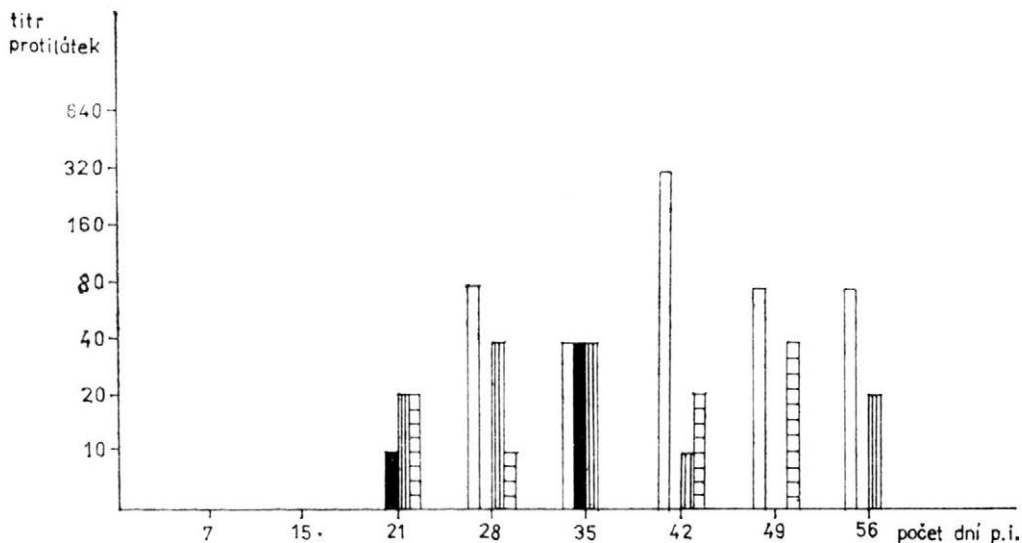
Text je uveden u tab. I

izolovány z plic, jater a sleziny morčat infikovaných perorálně (skupina II) a konjunktiválně (skupina IV) — 49. den (tab. I). Ve stejném časovém období byla pozitivní izolace brucel z jater morčete (č. 11) infikovaného subkutánně (skupina V — tab. II).

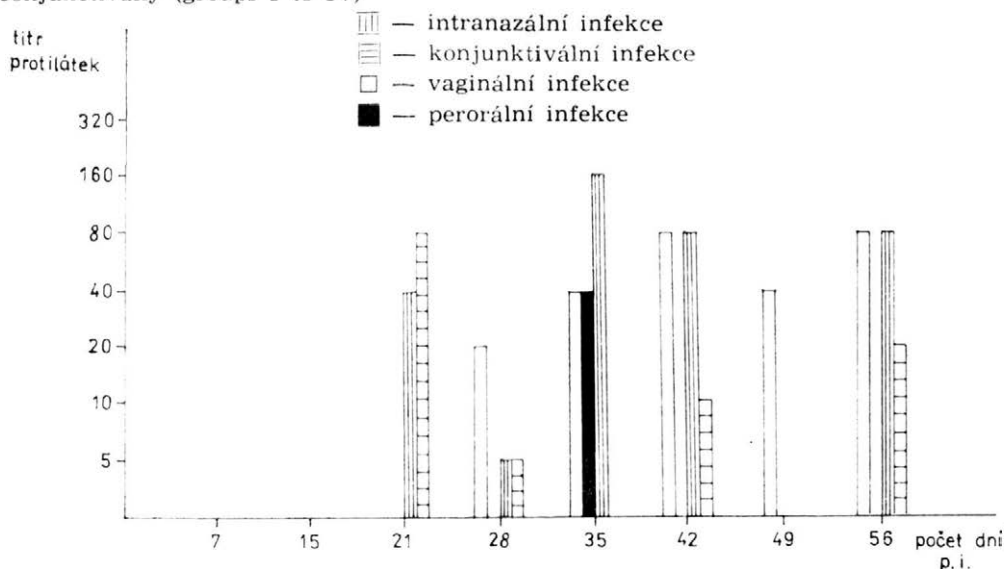
Morfologické vyšetření

Morfologické změny v orgánech infikovaných morčat jsou přehledně uvedeny v tab. III (skupina I—IV) a tab. IV (skupina V).

V játrech jsme patologicko-anatomicky zjistili nodulární bru-

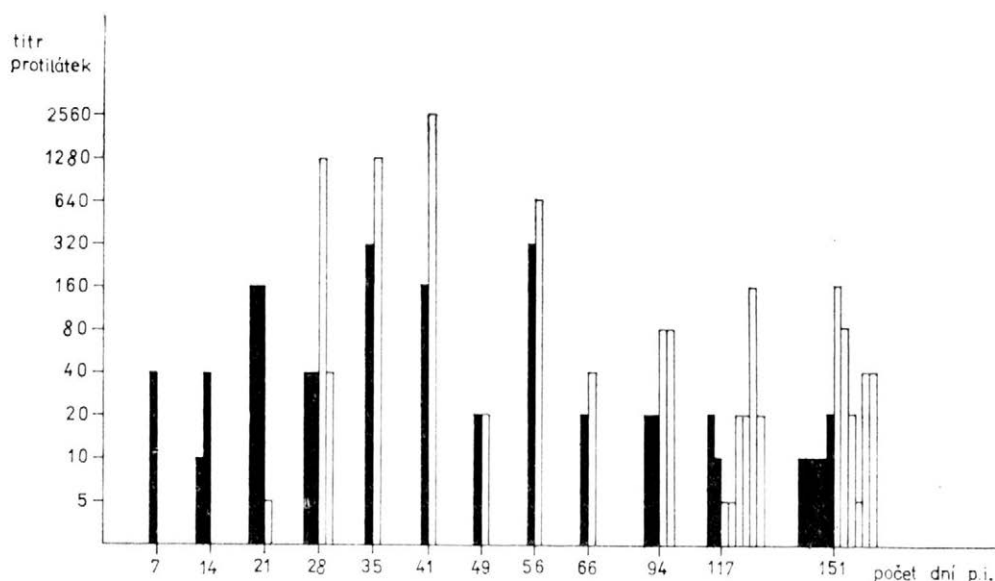


1. Dynamika titrů aglutinačních protilátek u morčat infikovaných vaginálně, perorálně, intranazálně a konjunktiválně (skupina I—IV) — The dynamics of titres of agglutination antibodies in guinea pigs infected vaginally, perorally, intranasally and conjunctivally (groups I to IV)



2. Dynamika titrů komplementfixačních protilátek u morčat infikovaných vaginálně, perorálně, intranazálně a konjunktiválně (skupina I—IV) — The dynamics of titres of complement-fixation antibodies in guinea pigs infected vaginally, perorally, intranasally and conjunctivally (groups I to IV)

celózní změny nejdříve po subkutánní a konjunktivální infekci — sedmý den, po vaginální a intranazální infekci 21. den a po perorální infekci až 28. den. Další vývoj změn v játrech infikovaných morčat byl plynulý a největší léze o průměru 4 až 6 mm se vyskytovaly 49. až 56. den *p. i.* (obr. 4). Pouze po perorální infekci nebyla velikost změn větší než 2 mm. Histologicky se konstantně zjišťovala aktivace elementů RES (obr. 5). Iniciální stadia brucelózních granulomů byla tvořena shluky



3. Dynamika titrů aglutinačních a komplementfixačních protilátek u morčat infikovaných subkutánně (skupina V) — The dynamics of titres of agglutination and complement-fixation antibodies in guinea pigs infected subcutaneously (group V)

■ — aglutinační protilátky

□ — komplementfixační protilátky

histiocyty, lymfoplazmocytárních elementů a ojedinělých neutrofilů. Drobné granulomy byly tvořeny nepravidelně uspořádanými epiteloidními buňkami a histiocyty, kolem kterých se v různém počtu vyskytovaly lymfoplazmocytární buněčné elementy (obr. 6). Ve větších granulomech



4. Játra morčete infikovaného intranasálně — 56. den po infekci. V parenchymu jsou zřetelné větší solitérní bruceleózní granulomy lokalizované subkapsulárně — Liver of a guinea pig infected intranasally — 56th day after infection. Large solitary brucellosis granulomas localized subcapsularly are visible in parenchyma

III. Výsledky morfologického vyšetření morčat — skupina I až IV — The results of morphological examination of guinea pigs — groups I to IV

Den odběru materiálu p. i.	Číslo morčete/ způsob infekce	Játra		Slezina		Plíce	
		makro	mikro	makro	mikro	makro	mikro
7.	1/I	—	+	—	+	—	IHP
	1/II	—	+	—	+	—	IHP
	1/III	—	+	—	+	—	IHP
	1/IV	+	++	FT	+	—	IHP
14.	2/I	—	+	FT	+	—	IHP/++
	2/II	—	+	FT	+	—	IHP/++
	2/III	—	+	FT	+	—	IHP/++
	2/IV	++	+++	FT	+	—	IHP/++
21.	3/I	+	+++	FT	+	—	IHP/++
	3/II	—	+	FT	+	—	IHP/++
	3/III	+	+++	FT	+	—	IHP/++
	3/IV	+	+++	FT	+	—	IHP/++
28.	4/I	+	+++	FT	+	—	IHP/+++
	4/II	+	+++	FT	+	—	IHP/+++
	4/III	++	+++	FT	+	—	IHP/+++
	4/IV	++	+++	FT	+	—	IHP/+++
35.	5/I	++	+++	FT	+	—	IHP/++++
	5/II	++	+++	FT	+	—	IHP/++++
	5/III	++	+++	FT	+	—	IHP/++++
	5/IV	++	+++	FT	+	—	IHP/++++
42.	6/I	+++	+++	FT	+	—	IHP/++++/K
	6/II	+++	+++	FT	+	—	IHP/++++/K
	6/III	+++	+++	FT	+	—	IHP/++++/K
	6/IV	+++	+++	FT	+	—	IHP/++++/K
49.	7/I	++++	++++/K	FT	++	—	IHP/++++
	7/II	++	+++	FT	++	—	IHP/++++
	7/III	++	+++	FT	++	—	IHP/++++
	7/IV	+++	++++/K	FT/+	+++	—	IHP/++++
56.	8/I	++++	++++/K	FT	+++	—	IHP/++++
	8/II	++	+++	FT	+++	—	IHP/++++
	8/III	++++	++++/K	FT	+++	—	IHP/++++
	8/IV	++++	++++/K	FT	+++	—	IHP/++++

IV. Výsledky morfologického vyšetření morčat — skupina V (subkutánní infekce)
cutaneous infection)

Den odběru materiálu <i>p. i.</i>	Číslo morčete	Játra		Slezina		Plíce	
		Ma	Mi	Ma	Mi	Ma	Mi
7.	1 2	++ +	+++ +++	FT FT	++ ++	— —	IHP IHP
14.	3 4	++ +	+++ +++	FT FT	++ ++	— —	IHP/++ IHP/++
21.	5 6	++	+++	FT	++	—	IHP/++
28.	7 8	+++	++++/K	FT	++++/K	++	IHP/+++
35.	9	+++	++++/K	FT	++++/K	++	IHP/+++
41.	10	+++	++++/K	FT	++++/K	+++	IHP/++++
49.	11	++++	++++/K	FT	++++/K	—	IHP/++++
56.	12 13	++++	++++/K	FT	++++	—	IHP/++++
66.	14	++	++++	FT/T	F	—	IHP/++++
94.	15	+	+++	—	F	—	IHP/++++
	16 17 18	++	++++	FT	+++	—	IHP/++++
117.	19	++	++++	—	F	—	IHP/+++/F
	20	++	++	—	F	—	IHP/+++/F
	21	++++	++++/K	—	F	—	IHP/+++/F
	22 23 24	+++	++++/K	—	F	—	IHP/+++/F
151.	25	++	+++	—	F	—	IHP/+++/F
	26	++++	++++/K/Ca	—	F	—	IHP/+++/F
	27	++	+++	—	F	—	IHP/+++/F
	28	++	+++	—	F	—	IHP/+++/F
	29	++	+++	—	F	—	IHP/+++/F
	30	+++	++++/K/Ca	—	F	—	IHP/+++/F

Text k tab. III a IV:

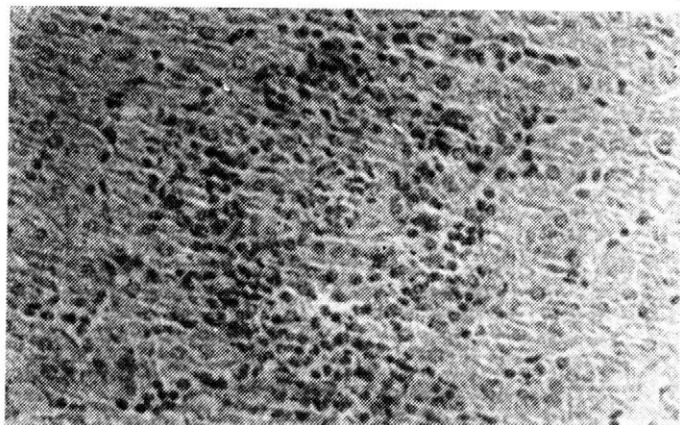
Infekce: I — vaginální; II — perorální; III — intranazální; IV — konjunktivální; V — subkutánní.
Charakteristika změn:

makro (Ma): — negativní; + ojedinělé submiliární až miliární granulomy; ++ četné submiliární až miliární granulomy; +++ ve změnách i výskyt ojedinělých granulomů větších velikostí; ++++ ve změnách výskyt četných granulomů větších velikostí (nad 2 mm); zvětšení mzních uzlin je vyjádřeno počtem ×.

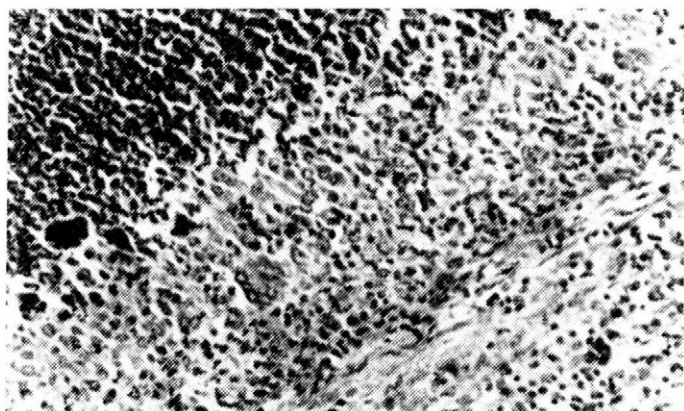
Mízní uzliny							
povrchová tříselná				kyčelní			
levá		pravá		levá		pravá	
Ma	Mi	Ma	Mi	Ma	Mi	Ma	Mi
E —	Po/SK —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
× × ×/E/H × × ×/E/H	++++/K ++++/K	— —	— —	× × ×/E × × ×/E	+++ +++	— —	— —
× × ×/E/H	++++/K	—	—	× × ×/E × × ×/E	+++ +++	—	—
× × ×/E	++++/K	—	—	× × ×/E	++++/K	—	—
× × ×/T	++++/K/F	× × ×/E	+++	× × ×/E	++++/K	× × ×/E	+++
× × ×/A/T	++++/K/F	×/E	+++	× × ×/T	++++/K/F	×	+++
× × ×/A/T	++++/K/F	—	—	× × ×/T	++++/K/F	—	—
× × ×/T	++++/K/F	—	—	× × ×/T	+++ /F	—	—
× × ×/T	++++/K/F	—	—	× × ×/T	+++ /F	—	—
× × ×/A/T	++++/K/F	—	—	× × ×/T	+++ /F	—	—
× × ×/A/T	++++/K/F	—	—	× × ×/T	+++ /F	—	—
× × ×/A/T	++++/K/F	—	—	—	—	—	—
× × ×/T	++++/K/F	—	—	—	—	—	—
× × ×/T	++++/K/F	—	—	—	—	—	—
× × ×/A/T	++++/K/F	—	—	—	—	—	—
× × ×/A/T	++++/K/F	—	—	—	—	—	—
× × ×/A/T	++++/K/F	—	—	—	—	—	—
× × ×/T	++++/K/F	—	—	—	—	—	—
× × ×/T	++++/K/F	—	—	—	—	—	—

mikro (Mi): — negativní; + aktivace RES; ++ výskyt iniciálních stadií granulomů; +++ výskyt ojedinělých epiteloidních a histiocytárních granulomů; ++++ výskyt četných brucelózních granulomů;

IHP — intersticiální histiocytární pneumonie; FT — folikulární tumor; K — centrální kolikvace granulomů; F — fibróza; Ca — kalcifikace v centrálních nekrotických granulomů; Po — polarizace; SK — sinusový katar; A — abscedace; T — orgán tužší konzistence; E — edém; H — závažná hyperémie.



5 Játro (HE). Iničiální stadium brucelózního granulomu. Subkutánní infekce — 14. den — Liver (HE). Initial stage of brucelotic granuloma. Subcutaneous infection — 14th day



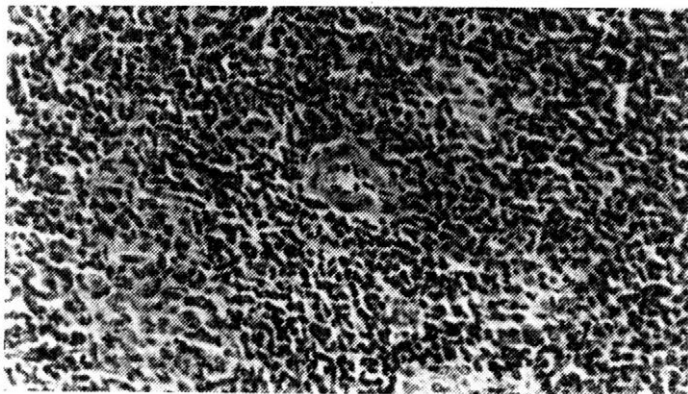
6. Játro (HE). Histologická skladba brucelózního granulomu. Vaginální infekce — 56. den. V centrální nekróze je charakteristická hnisavá kolikvace (vlevo nahoře). Periferně od nekrózy je histiocytární vrstva, ve které se vyskytují ojediněle obrovské mnohobudné buňky Langhansova typu a neutrofilní leukocyty. Směrem k okraji granulomu je málo výrazná zóna lymfoplazmocytárních buněk, na kterou navazuje vrstva fibroblastů, vytvářející periferní fibrotizaci granulomu — Liver (HE). Histological structure of brucelotic granuloma. Vaginal infection — 56th day. Typical purulent colligation is in central necrosis (above left). Peripherally

from the necrosis there is a histiocyte layer in which single giant polynuclear cells of the Langhans type and neutrophil leucocytes are visible. In the direction of granuloma margin a less marked zone of lymphoplasmacyte cells with the contiguous fibroblast layer forming the peripheral granuloma fibrotization is located

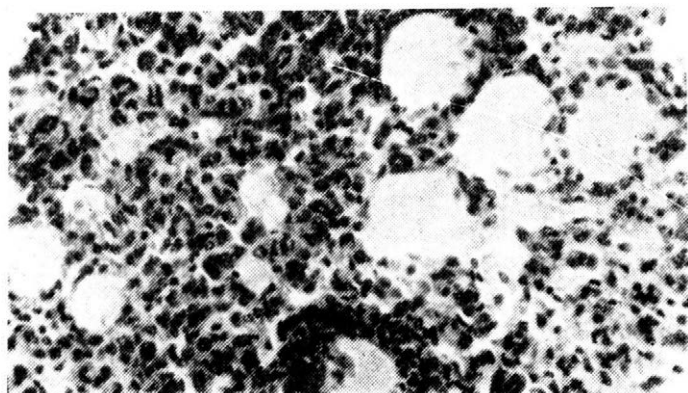
byla charakteristická centrální hnisavá kolikvace. Centrální partie těchto granulomů byly tvořeny nekrózami, které obsahovaly velké množství jaderného detritu v důsledku karyorektického rozpadu buněk, především neutrofilních leukocytů, které se v nekrózách vyskytovaly ve velkém množství. Nekrózy obsahovaly i drobné kapénky lipidů. Kolem nekróz byla různě široká vrstva epiteloïdních buněk a histiocytů, v níž se nekonstantně vyskytovaly obrovské buňky Langhansova typu. Periferně navazovala různě výrazná vrstva lymfoplazmocytárních buněk a úplně na okraji granulomů byla vrstva fibroblastů, která vytvářela jejich periferní fibrotizaci. U dvou morčat (č. 26, 30) jsme v kaseózních nekrózách větších granulomů prokázali kalcifikace.

Slezina vykazovala obraz folikulárního tumoru. Makroskopicky jsme nodulární afekce zjistili pouze po konjunktivální infekci (49. den). Histologické změny byly nejvýraznější od 28. do 49. dne po subkutánní infekci a 56. den po ostatních způsobech infekcí (skupina I–IV). Jejich podstatou byly drobné epiteloïdní a histiocytární granulomy, které

7. Slezina (HE). Konjunktivální infekce — 49. den. Iniciální stadia epiteloidních granulomů v Malpighiově tělisku — Spleen (HE). Conjunctival infection — 49th day. Initial stages of epithelioid granulomas in the Malpighian corpuscle



8. Plíce (HE). Intranasální infekce — 21. den. Intersticiální histiocytární pneumonie — Lungs (HE). Intranasal infection — 21st day. Interstitial histiocyte pneumonia

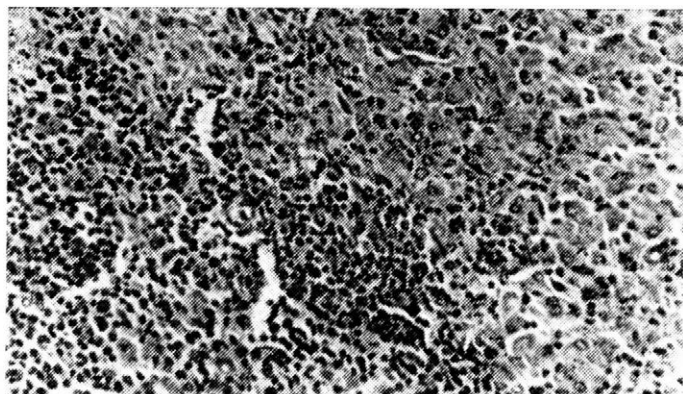


postihovaly především Malpighiova tělíska. Po subkutánní infekci se od 66. dne projevovala proliferace podpůrné tkáně sleziny a počínající atrofie Malpighiových tělísek. V 94. až 151. dnu *p. i.* byla patrná fibróza a 151. den jsme v některých centrech Malpighiových tělísek pozorovali jizvení [obr. 7].

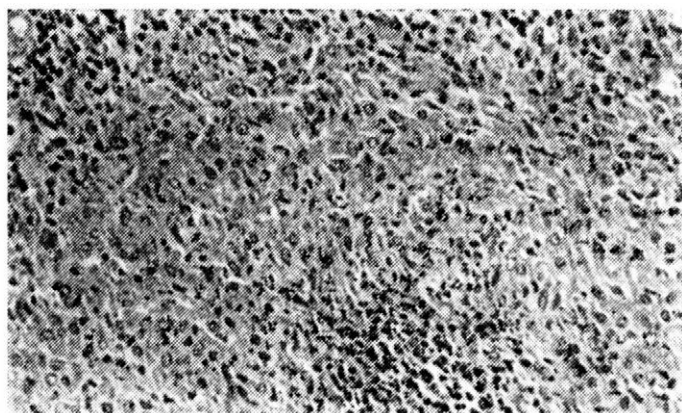
V plicích všech infikovaných morčat byla od sedmého dne intersticiální histiocytární pneumonie [obr. 8]. Makroskopické změny ve formě submiliárních až miliárních uzlíčků v parenchymu plic jsme zjistili pouze po subkutánní infekci od 28. do 41. dne. Histologické změny byly nejvýraznější 42. den *p. i.* (skupina I—IV) a od 41. do 94. dne *p. i.* (skupina V). Od 21. dne *p. i.* se v histiocytární vrstvě granulomů vyskytovaly i obrovské vícejaderné elementy Sternbergova typu. V plicích subkutánně infikovaných morčat bylo od 117. dne intersticiální vazivo kolagenizované a projevovала se fibróza, která byla 151. den značně pokročilá.

V mízních uzlinách se morfológické změny vyskytovaly pouze u morčat infikovaných subkutánně. Tyto změny jsme konstantně zjišťovali v regionálních mízních uzlinách, které odpovídaly místu infekce — v levých povrchových tříselných (*lnn. inguinales superf.*) a levých kyčelních (*lnn. iliaci*) mízních uzlinách.

Změny byly nejvýraznější v levých tříselných povrchových mízních uzlinách, a to od 41. do 94. dne *p. i.* Histologicky jsme



9. Regionální levá povrchová tříselná mizní uzlina (HE). Subkutánní infekce — 14. den. Rozsáhlé epitelioidní granulomy v lymfatických folikulech — Regional left inguinal gland (HE). Subcutaneous infection — 14th day. Extensive epithelioid granulomas in lymphatic follicles



10. Regionální levá povrchová tříselná mizní uzlina (HE). Karyoretický rozpad v centru lymfatického folikulu. V nekróze četné neutrofilní leukocyty, periferně zóna epitelioidních buněk. Subkutánní infekce — 14. den — Regional left inguinal gland (HE). Caryoretic disintegration in the centre of lymphatic follicle. In necrosis there are numerous neutrophil leucocytes, peripherally a zone of epithelioid cells. Subcutaneous infection — 14th day

již od 14. dne *p. i.* pozorovali výrazné tuberkuloidní granulomatózní změny. V histiocytární vrstvě granulomů se často vyskytovaly obrovské mnohoaderné buňky Langhansova typu (obr. 9, 10). V granulomech pravidelně docházelo k centrální hnisavé kolikvaci. Od 41. dne *p. i.* bylo vazivové pouzdro mizních uzlin fibrózně ztlustělé a v parenchymu byla patrná tvorba vaziva vycházejícího z hilu s počínající fibrózou, která v dalším průběhu infekce progredovala. S postupující fibrózou jsme v mizních uzlinách pozorovali úbytek granulomatózních změn.

V levých kyčelních mizních uzlinách nebyly změny tak výrazné jako v levých tříselných povrchových uzlinách (obr. 11). Morfologické změny jsme zaznamenali od 14. do 94. dne *p. i.* (tab. IV).

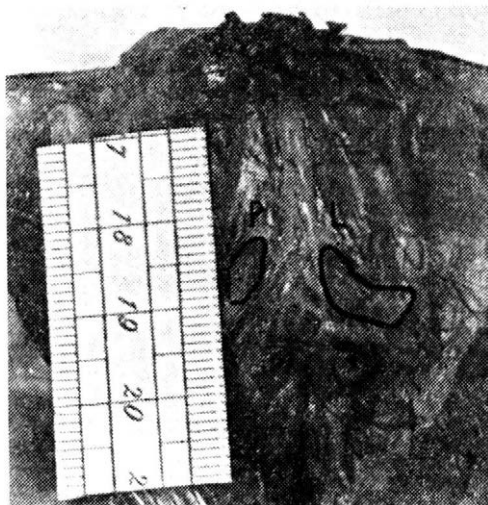
V pravých tříselných povrchových a kyčelních mizních uzlinách jsme morfologické změny zjišťovali od 35. do 41. dne *p. i.* (tab. IV).

V jiných mizních uzlinách se vyskytovaly změny pouze v jednom případě (morče č. 26; tab. IV) 151. den *p. i.*; jednalo se o abscedaci paraaortálních mizních uzlin.

Výživný stav všech infikovaných morčat byl vesměs výborný a v průběhu pokusu jsme ani v jednom případě nezaznamenali úhyn.

Sérologické, bakteriologické a morfologické vyšetření kontrolních morčat bylo negativní.

11. Zvětšení regionální — levé kyčelní mizní uzliny (L). Pravá uzlina (P) je bez makroskopických změn. Subkutánní infekce — 56. den — Regional hypertrophy — left hip lymphoglandulae (L). Right lymphoglandula (P) without macroscopic changes. Subcutaneous infection — 56th day



DISKUSE

Nejvyšší sérologická reaktivita byla u morčat infikovaných subkutánně. Kvalitativní metody byly pozitivní sedmý den a PA byl zjištěn pozitivní titr protilátek. V dalším průběhu této infekce jsme zjišťovali vyšší titry aglutinačních a komplementfixačních protilátek než při ostatních infekcích. Nejnižší sérologická reaktivita byla po perorální infekci. V průběhu jednotlivých infekcí titry protilátek kolísaly. Zjištěné nejvyšší titry aglutininů v krvi infikovaných morčat v podstatě souhlasí s výsledky, které uvádí Nikolov (1973). Tento autor zjistil, že titry aglutinačních protilátek byly nejvyšší od 30. do 60. dne *p. i.*

U subkutánní infekce, u níž jsme sledovali vývoj protilátkové odezvy za delší časové období, jsme zjistili, že protilátková odezva infikovaných morčat se ve stejném časovém období lišila a titry aglutinačních a komplementfixačních protilátek v jejím průběhu kolísaly. Toto zjištění lze vysvětlit individuální vnímavostí morčat k brucelózní infekci.

Povrchově fixační test jako kvalitativní sérologická metoda byl dobře použitelný a byl pozitivní ještě 151. den *p. i.*, tj. i v období chronické fáze brucelózy. Naproti tomu John aj. (1964) doporučují jeho použití v diagnostice akutních forem brucelózy u lidí. Na rozdíl od Johna aj. (1964) jsme nezjistili snížení citlivosti PFT v chronické fázi brucelózního procesu.

Vzhledem k nízké sérologické reaktivitě po perorální infekci, na kterou upozorňuje i Juskovec (1955), bude ještě třeba tuto otázku zkoumat na větším počtu zvířat.

Izolace brucel z orgánů infikovaných morčat byla úspěšná pouze ve fázi bakteriémie, která podle údajů Sergina a Voždajeva (1973) trvá do 30. dne *p. i.* V souladu se závěry, které uvádí Štěrba (1982, 1983), bude třeba věnovat větší pozornost i bakteriologickým aspektům brucelózy. Vzhledem k chronicitě procesu a intracelulární lokalizaci brucel v orgánech bývá toto vyšetření často negativní.

Zajímavým zjištěním byla izolace brucel z orgánů subkutánně, perorálně a konjunktiválně infikovaných morčat ještě 49. den (tab. I, II). Tento nález však nemůžeme blíže vysvětlit, stejně tak jako v případě perorální infekce, při níž bylo 49. den bakteriologické vyšetření pozitivní, ale RA, PA a PFT byly negativní a výsledek metodou RVK nebylo možné hodnotit (tab. I).

Výsledky morfologického vyšetření dokázaly, že morčata jsou vnímavá ke všem způsobům infekcí a ve všech případech byly vyvolány brucelózní změny. Brucelóza měla chronický a lokálně progresivní charakter, což souhlasí i s výsledky, které zjistil Štěrba (1983, 1984). Mikroskopickou podstatou změn byl histiocytární granulom. Ve starších granulomech pravidelně docházelo k sekundární hnisavé kolikvaci, kterou v souladu se závěry uváděnými Juskovcem (1955) a Štěrbou

(1983, 1984) považujeme za charakteristický morfologický znak brucelózních změn u morčat.

Ve vývoji morfologických změn v orgánech infikovaných morčat jsme zjistili rozdíly v makroskopickém i mikroskopickém obrazu, a to v závislosti na způsobu a délce infekce. Nejméně výrazné byly změny po perorální infekci, což odpovídá výsledkům, které uvádí Juskovec (1955).

V játrech jsme histologicky konstantně zjišťovali výraznou aktivaci RES, kterou popisují také Braude a Spink (1951). Zjištěné morfologické změny v plicích odpovídaly nálezům i dalších autorů (Godglück, 1952; Juskovec, 1955; Kersten, 1955; Nikolov, 1973; Ryžkovová, 1974; Stěrba, 1983, 1984). V souladu s výsledky, které uvádějí Kersten (1955) a Nikolov (1973), nebyl výskyt obrovských buněk v histiocytární vrstvě granulomů konstantní.

Slezina poskytovala obraz folikulárního tumoru, který však nebyl tak výrazný, jako uvádí Juskovec (1955). Na rozdíl od dalších autorů (Godglück, 1952; Juskovec, 1955; Kersten, 1955; Nikolov, 1973) jsme konstantní výskyt nodulárních afekcí ve slezině makroskopicky nezjistili.

V plicích se konstantně projevovala intersticiální histiocytární pneumonie. Obdobné změny po subkutánní infekci zjistili také jiní autoři (Kersten, 1955; Nikolov, 1973; Ryžkovová, 1974). Podobně jako Kersten (1955) jsme v histiocytární vrstvě granulomů zjišťovali obrovské elementy Sternbergova typu. Je třeba upozornit na to, co ostatní autoři neuvádějí, že v plicích se v průběhu subkutánní infekce vyskytovala od 117. dne výrazná fibróza, která byla důsledkem progresivní intersticiální pneumonie.

Na rozdíl od výsledků, které zjistila Ryžkovová (1974), byly v našich případech postiženy jen regionální mízní uzliny. V centrech granulomů se konstantně vyskytovala hnísavá kolikvace a v jejich histiocytární vrstvě jsme často zjišťovali obrovské mnohojaderné buňky Langhansova typu, což odpovídá výsledkům dalších autorů (Godglück, 1952; Nikolov, 1973; Ryžkovová, 1974).

Z výsledků patologicko-morfologického vyšetření vyplývá, že v šíření brucelózního procesu v organismu morčat má prioritní význam hematogenní propagace, což potvrzují údaje i dalších autorů (Godglück, 1952; Wellmann, 1952; Juskovec, 1955; Nikolov, 1973; Ryžkovová, 1974).

Zdrovovskij (1953) experimentálně prokázal, že brucelózní infekce morčat končila spontánním uzdravením. Z našich výsledků vyplývá, že v chronické fázi brucelózního procesu vystupovala do popředí ve slezině, plicích a regionálních uzlinách progresivní fibróza. Zánik tvorby granulomů jsme však zjistili pouze ve slezině. Proto k potvrzení možnosti spontánního uzdravení morčat by bylo potřeba delší doby než 151 dní. Nelze však vyloučit, že v důsledku fibrózy v plicích a slezině by později mohlo dojít k vážné poruše jejich funkcí s následným exitem morčat.

Z výsledků morfologického a sérologického vyšetření vyplývá, že byla zjištěna neúplná korelace mezi histopatologickými a v některých případech i patologicko-anatomickými změnami a sérologickou reaktivitou morčat, což souhlasí i se závěry dalších autorů (Godglück, 1952; Kersten, 1955; Nikolov, 1973).

Z dosažených výsledků dále vyplývá, že největší počet případů brucelózních infekcí byl zjištěn morfologickým (zejména histopatologickým) vyšetřením. Tímto vyšetřením byla odhalena i diskrétní stadia granulomů v době, kdy sérologickým vyšetřením ještě nebyly specifické protilátky zjištěny. Morfologické vyšetření umožnilo zjistit i výskyt brucelózních afekcí v orgánech, a to v případech, kdy výsledky sérologického vyšetření nebylo možné hodnotit z důvodu hemolýzy krve nebo antikomplementarity séra morčat, což se v průběhu pokusu stávalo. Morfologické vyšetření na základě charakteristických makroskopických i mikroskopických změn tak významně přispívá k vyšší zachytivosti a průkaznosti brucelózních infekcí v rámci komplexní laboratorní diagnostiky brucelózy. Umožňuje zjistit změny i v chronickém stadiu brucelózní infekce, kdy bývá bakteriologické vyšetření negativní.

Poděkování.

Za technickou spolupráci děkujeme D. Šlíglové.

Literatura

- BRAUDE, A. I. — SPINK, W. W.: Studies in the pathology and pathogenesis of experimental brucellosis. J. infect. Dis., 89, 1951, s. 272-276.
- CODGLUCK, G.: Die pathologisch-anatomischen und histologischen Veränderungen mit Brucellosebakterien infizierten Meerschweinchen und ihre diagnostische Bedeutung. Zentbl. Bakt., 159, 1952, s. 63-70.
- JOH, C. — KRABCOVÁ, I. — DUŠKOVÁ, B. — GERŠL, F.: Sérologické reakce na pirovém nosiči. Čs. Epid. Imunol., 12, 1964, s. 213-220.
- JUSKOVEC, M. K.: Brucelosa hospodářských zvířat. Praha, SZN 1955. 288 s.
- KERSTEN, W.: Zur Pathologie und Histologie der *Brucella suis* Infektion des Meerschweinchen und ihre diagnostische Bedeutung. Zentbl. Veter.-Med., 11, 1955, s. 667-673.
- NIKOLOV, N.: Proverka na serologičnite reakcii pri brucelozni svine čerez patomorfologični izsledovanija i I. soobščeniye. Opit s morskii svinčeta, eksperimentalno zarazeni s *Br. suis*. Naučni trudove Vys. Vet. Med. Inst. I. P. Pavlova, 23, 1973, s. 329-339.
- RYŽKOVÁ, L. P.: Morfoložičeskije i gistohimičeskije izmijeněnija v organa laboratornyh životnyh zaražennyh R-formoj brucell. Sbor. nauč. rabot., Omsk, 21, 1974, s. 74-76.
- SERGIN, J. K. — VOŽDAJEV, N. S.: Patomorfologija pri eksperimentalnom brucelozе jakov. Veterinarija, 49, 1973, s. 56-58.
- ŠTERBA, F.: Patomorfologické změny u brucelózních zajíců. Veter. Med. (Praha), 27, 1982, č. 7, s. 437-448.
- ŠTERBA, F.: Brucelóza zajíců — morfologická studie. [Kandidátská disertace.] Brno 1983, 246 s. — Vysoká škola veterinární.
- ŠTERBA, F.: Morfoložické změny u brucelózy morčat, vyvolané experimentální infekcí zárodky *Brucella suis*. Veter. Med. (Praha), 29, 1984, č. 6, s. 359-372.
- WELLMANN, G.: Experimentelle Untersuchungen über die Möglichkeit der Brucellenübertragung durch Insekten. Zentbl. Bakt. Parasitkde., 159, 1952, s. 71-86.
- ZDRODOVSKIJ, P. F.: Brucellez. Moskva, AMN 1953.
- ŽOVANIK, P. N.: Brucellez. Kijev, Urožaj 1955.

Došlo dne 19. 7. 1984

ШТЕРБА, Ф. — ЗАМЕК, Л. — ГАЛАЧКОВА, М. — КРАЦЛИКОВА, В. (Государственный ветеринарный институт, Йиглава): Динамика морфоизменений и реакции антител у морских свинок, экспериментально зараженных бактериями *Brucella suis*, биотип 2. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10): 611-623.

Вагинальным, пероральным, интраназальным, конъюнктивальным и подкожным способами заражали 62 морские свинки бактериями *B. suis*, биотип 2. Инокулум содержал $13,8 \cdot 10^9$ бруцелл в мл физиологического раствора. В случае подкожного заражения инфекция длилась 151 день, в остальных — 56 дней. Всеми способами вызывали бруцеллезные изменения, которые развивались в зависимости от способа и продолжительности заражения. Наименее заметные изменения вызвало пероральное заражение. Бруцеллез протекал хронически, изменения константно отмечали в печени, селезенке, легких, а после подкожного заражения — и в региональных лимфатических узлах. Микроскопической основой изменений служит гистиоцитарный гранул. В патогенезе бруцеллезного процесса первоочередное значение имеет гематогенная пропация. Максимальная серологическая активность развивается после подкожного заражения, а минимальная — перорального. В ходе отдельных способов заражения титры агглютинальных и комплементфиксирующих антител колеблются, становясь наибольшими в период от 21 до 56 дня. Проверили и диагностическую эффективность поверхностнофиксационного теста — не отмечено понижения его чувствительности даже в хронической фазе инфекции. Установлена неполная корреляция между морфоизменениями и серологической реактивностью свинок. Наибольшее количество бруцеллезных инфекций установлено в результате гистопатологического исследования, которое обнаружило уже инициальную стадию грануломов в период, когда при серологическом исследовании эти специфические антитела обнаружены не были.

вагинальное, пероральное, интраназальное, конъюнктивальное и подкожное заражение; бруцеллезные изменения; патологическая морфология; серологическая реактивность; динамика титров антител

ŠTĚRBA, F. — ZÁMEK, L. — HALAČKOVÁ, M. — KRACLÍKOVÁ, V. (State Veterinary Institute, Jihlava): *The Development of Morphological Changes and Antibody Response in Guinea Pigs Infected Experimentally with the Bacteria Brucella suis, Biotyp 2*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 611-628.

Sixty-two guinea pigs were infected vaginally, perorally, intranasally, conjunctivally and subcutaneously with the bacteria *B. suis*, biotype 2. The inoculum contained $13.8 \cdot 10^9$ of brucellas in 1 ml of physiological solution. Subcutaneous infection lasted 151 days, the other types of infection 56 days. All types of infections resulted in brucellotic changes developing in relation to the type and duration of infection. The least marked changes were observed after peroral infection. Brucellosis was chronic and the changes in liver, spleen, lungs, and after subcutaneous infection also in regional lymphoglandulae, were found out incessantly. Microscopically these changes were histiocytic granulomas. The pathogenesis of brucellosis process in guinea pig organism is influenced primarily by hematogenous propagation. The highest serological reactivity was caused by subcutaneous infection, the lowest by peroral infection. In the course of different types of infection the titres of agglutination and complement-fixation antibodies varied and the highest values were recorded between the 21st and 56th day. The diagnostic effectiveness of the surface fixation test was verified and no decrease in its sensitivity, not even in the chronic phase of infection, was observed. An incomplete correlation between morphological changes and serological reactivity in guinea pigs was detected. The highest number of *Brucella* infections was identified by histopathological examination which helped to reveal the initial stages of granulomas at the time when specific antibodies were not yet determined by serological tests.

vaginál, perorál, intranasál, konjunktivál a subkutánní infekce; brucelotické změny; patologická morfologie; serologická reaktivita; dynamika titrů

ŠTĚRBA, F. — ZÁMEK, L. — HALAČKOVÁ, M. — KRACLÍKOVÁ, V. (Staatliches veterinärmedizinische Institut, Jihlava): *Entwicklung morphologischer Veränderungen sowie Antikörperreaktionen von mit Bakterien Brucella suis, Biotyp 2, experimentell infizierten Meerschweinchen*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 611-628.

Auf vaginale, perorale, intranasale, konjunktivische und subkutane Weise haben wir 62 Meerschweinchen mit Bakterien *B. suis*, Biotyp 2, infiziert. Das Inokulum enthielt $13,8 \cdot 10^9$ Brucellen in 1 ml physiologischer Salzlösung. Bei der subkutanen Inokulation dauerte die Infektion 151 Tage, bei den übrigen Infektionen 56 Tage. Sämtliche angeführte Methoden riefen brucellose Veränderungen hervor, die sich in Abhängigkeit von der Methode und der Länge der Infektion entwickelten. Am wenigsten ausgeprägte Veränderungen kamen nach der peroralen Infektion zum Vorschein. Die Brucellose verlief chronisch und die Veränderungen konnten konstant in der Leber, in der Milz, in der Lunge und nach der subkutanen Infizierung ebenfalls in den regionalen Lymphknoten festgestellt werden. Mikroskopisch lagen den Veränderungen histiozytäre Granulome zugrunde. In der Pathogenese des Brucelloseprozesses im Organismus der Meerschweinchen ist die hämatogene Propagation von Prioritätsbedeutung. Die höchste serologische Reaktivität wurde nach der subkutanen, die niedrigste nach der peroralen Infizierung verzeichnet. Im Verlauf der einzelnen Infektionsmethoden schwankten die Titer der Agglutinations- und Komplementbindungs-Antikörper. Am höchsten waren sie zwischen dem 21. bis 56. Tag. Wir überprüften auch die diagnostische Effizienz des Oberflächen-Fixierungstestes und stellten keine Herabsetzung seiner Sensibilität fest. Auch nicht in der chronischen Phase der Infektion. Wir konnten eine unvollständige Korrelation zwischen den morphologischen Veränderungen und der serologischen Reaktivität der Meerschweinchen feststellen. Die höchste Zahl von Brucelloseinfektionsfällen gelang es durch histopathologische Untersuchung zu ermitteln. Mit ihrer Hilfe wurden bereits Initialstadien der Granulome zu einem Zeitpunkt entdeckt, wo durch serologische Untersuchung noch keine spezifischen Antikörper festzustellen waren.

vaginálné, perorálné, intranasálné, konjunktívne, subkutánne infekcie; brucelózne zmeny; patologická morfológia; serologická reaktivita; dynamika titrov

Adresa autorů:

MVDr. František Štěrbá, CSc., MVDr. Ladislav Zámek, MVDr. Marie Halačková, MVDr. Věra Kracíková, Státní veterinární ústav, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

VLIV IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ NA STRUKTURÁLNÍ ZMĚNY ENERGETICKÝCH ŽIVIN V KRMIVECH

J. Dvořák, K. Šmíd, J. Hrušovský

DVOŘÁK, J. — ŠMÍD, K. — HRUŠOVSKÝ, J. (Vysoká škola veterinární, Brno; Vojenský veterinární doškolovací výzkumný ústav, Košice): *Vliv ionizujícího záření na strukturální změny energetických živin v krmivech*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 629-636.

K prověření vlivu ionizujícího záření byla po dobu 60 dnů sledována krmiva pro psy (masová krmná směs VETACAN a sypká krmná směs VETAVIT), ozářená radioizotopem Co 60 o intenzitě 25 kGy/kg. Vyšetřením bylo zjištěno, že celkový objem energetických a neenergetických živin se nemění. Kvalitativní struktura však vykazuje průkazný, v průměru 35% rozpad esenciálních aminokyselin, pokles bílkovin a nárůst volných amoniakálních bází. Uplatňuje se významný oxidační vliv radiace na rozklad tuku s uvolněním volných mastných kyselin z glycerolové vazby v procesu obdobném žluknutí (z 13,3 — 20,88 — 37,10 mg/g u masné směsi, ze 103,1 — 130,04 — 135,04 mg/g u sypké směsi). Jistý rozpad živin, ale v hranicích signifikance, se projevil i u sacharidového podílu sypké krmné směsi (KVV 348,8 — 403,99 — 436,60 mg/100 g). Bylo prokázáno, že radiosterilace spolehlivě zabezpečuje mikrobiologickou i mykologickou asanaci krmiv a nevyvolává lidskými smysly postřehnutelné senzorické změny. Z výsledků vyplývá, že ionizující záření má výraznou antimikrobiální a antimykotickou účinnost. Podmiňuje však významné strukturální změny energetických živin krmiv živočišné i rostlinné provenience.

radiosterilace; aminokyseliny; proteiny; lipidy; sacharidy; mikrobiologická úroveň; organoleptické změny

V poslední době je snahou zejména potravinářského, ale i krmivářského průmyslu k dosažení energetických úspor využívat i jiné než tradiční, méně nákladné energetické zdroje. Ke stabilizaci potravin a krmiv, mimo chemických systémů a tradičních fyzikálních postupů stabilizace, je předmětem intenzivního teoretického výzkumu a praktického ověřování také studium problematiky radiosterilace potravin a krmiv.

Tato fyzikální metoda, využívající účinků ionizačního záření k devitalizaci nežádoucí mikroflóry, je aktivní průnikem hmotných částic záření na úrovni molekulárních systémů, a tím podmiňuje sterilační efekt. Tato metoda stabilizace však s sebou přináší i některé nežádoucí změny, promítající se do kvalitativní oblasti krmiv.

Ze sledování krmiv živočišných i rostlinných (Dvořák, 1980) vyplynulo, že ionizující záření svým působením vedle mikrobiální asanace významně navozuje i rychlou, progresivní destrukci živin, především lipidů a proteinů, čímž podmiňuje chemicky prokazatelné změny v dietní jakosti krmiv. Degradace proteinu se na úkor aminokyselin

projevuje růstem volných amoniakálních bází; dále vzrůstá aktuální acidita krmiva, rozpadem tuků jsou z pevných vazeb uvolňovány mastné kyseliny. Kyzlink (1980) u potravin popisuje ztráty citlivých nutričních hodnot, vitamínů, aminokyselin, včetně esenciálních a jiných, jakož i nepříznivé změny vzhledových, chuťových a aromatických vlastností. Podle tohoto autora sice ionizující záření exponenciálně snižuje počet živých mikrobů, ale současně přináší produkci silně oxidujících zplodin, podporuje enzymové oxidační procesy, způsobuje rychlý rozpad vitamínů, zejména lipofilních, oxidaci tuků, myoglobinu apod. Absorpce záření způsobuje změny teploty materiálu se značným urychlením enzymových a jiných reakcí, které vedou k neoxidativním rozpadům nutričně i organolepticky cenných látek. Z ozářených bílkovin se odštěpují postranní řetězce a koncové skupiny, uvolňují se některé aminokyseliny, které podléhají rozpadu za produkce kyslíčnicku siřičitého, sirovodíku, fenolů, sulfidů, merkaptanu aj. Radiolytické narušení polysacharidů vede k nežádoucímu měknutí pletiv (Sande a Kovrainov, 1979). Proti těmto poznatkům stojí práce, které u krmiv pro selata dělali Sickel (1979) a při radiační asanaci diet pro laboratorní zvířata Adamiker (1979) a Ley (1979). Tito autoři neprokázali negativní vliv ionizujícího záření na degradační změny kvality krmiv.

Jako účinné sterilační hodnoty pro praktickou stabilizaci krmiv či potravin rostlinného a živočišného původu jsou různými autory (Mossel, 1979; Naduvári, 1979; Van Kooij, 1979; Eggum, 1979; Kyzlink, 1980) uváděny ionizující dávky záření od 3 do 7 kGy. Vzhledem k tomu, že dosavadní šetření o působení radiace v této oblasti neumožňují pro názorovou nejednotnost autorů považovat tento problém hygieny výživy zvířat i člověka za vyřešený, rozhodli jsme se prověřit vliv radiace na energetickou i biologickou hodnotu krmiv, především z hlediska jejich dietní a nutriční potence, jakož i schopnosti saturovat nároky látkového metabolismu.

MATERIÁL A METODA

Účinky radiace jsme prověřovali na krmivech živočišného i rostlinného původu ve složení masová krmná směs pro psy VETACAN a krmná směs pro psy VETAVIT.

Všechna použitá krmiva, ozářená i neozářená, byla laboratorně analyzována, a to před vystavením účinkům radiace a po něm a dále po 30 a 60 dnech. V krmivech byla sledována sušina, nespalitelný podíl, hladiny energetických živin (NL, tuk, BNLV a vláknina) a minerální látky (Ca, P, Mg, NaCl), obsah 16 esenciálních aminokyselin, hygienická úroveň jakosti živin určená kyselostí tuku a kyselostí vodního výluhu, množstvím peroxidu, aldehydů, epihydrinaldehydu a amoniaku, mikrobiologické vyšetření a organoleptické stanovení sledovaných vzorků (ČSN 46 7007, 1967; Veselý aj., 1978; Svoboda, 1974; ČSN 46 7011, 1974), prvky fotometricky a komplexometrickými titracemi, obsah amoniakyselin byl určován na AAA typu Mikrotechna Praha, typ 881, po hydrolytickém štěpení.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky získané vyšetřením ozářených i neozářených vzorků jsou uvedeny v tab. I a II.

Jak je v těchto tabulkách uvedeno, ze sledování vyplývá, že celkový objem živin v ozářených krmivech zůstává jak u energetických, tak u neenergetických živin na původní výši. Naproti tomu kvalitativní struktura se průkazně mění, což se zejména projevuje ve výrazném

I. Obsah energetických a neenergetických živin, aminokyselin a hygienická úroveň masové krmné směsi VETACAN vystavené účinkům pronikavé radiace — Content of energetic and non-energetic nutrients, amino acids and hygienic level of the meat feed mixture VETACAN, exposed to strong radiation

Sledovaný ukazatel	1		2		3	
	A	B	A	B	A	B
Sušina %	30,62	30,95	30,82	30,63	30,79	30,67
NL %	16,54	16,22	16,02	16,54	16,26	16,46
Tuk %	7,33	7,63	7,61	7,35	7,24	7,65
Popel %	5,50	5,98	5,99	5,30	5,65	5,38
Vláknina	—	—	—	—	—	—
BNLV %	1,25	1,12	1,20	1,44	1,64	1,18
Ca g/kg	18,92	19,96	17,84	20,24	19,09	18,47
P g/kg	10,92	9,96	10,58	9,36	10,10	9,83
Mg g/kg	0,63	0,48	0,58	0,50	0,40	0,59
KVV mg/100 g	—	—	—	—	—	—
KT mg/g	13,30	13,41	20,88	14,02	37,10	15,02
Peroxidy	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Aldehydy	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Epihydrinaldehyd	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Amoniak mg/100 g	12,94	12,57	40,88	13,62	44,28	18,39
Lyzin %	1,39	0,97	0,96	—	0,90	1,29
Histidin %	0,42	0,36	0,28	—	0,30	0,35
Arginin %	1,09	0,99	0,86	—	0,90	1,01
Kyselina asparagová %	1,55	1,45	1,34	—	1,04	1,29
Threonin %	0,68	0,58	0,56	—	0,47	0,56
Serin %	0,67	0,47	0,59	—	0,49	0,57
Kyselina glutamová %	2,58	2,47	2,15	—	1,70	2,42
Prolin %	1,37	1,35	1,12	—	0,93	1,30
Glycin %	1,90	1,80	1,67	—	1,45	1,70
Alanin %	1,33	1,23	1,06	—	0,94	1,18
Valin %	0,85	0,86	0,65	—	0,57	0,75
Methionin %	0,31	0,29	0,25	—	0,24	0,28
Isoleucin %	0,63	0,53	0,49	—	0,41	0,45
Leucin %	1,29	1,19	0,94	—	0,85	1,10
Tyrosin %	0,57	0,50	0,41	—	0,37	0,49
Phenylalanin %	0,69	0,60	0,51	—	0,44	0,58

Legenda: 1 — ihned po ozáření; 2 — 30 dnů po ozáření; 3 — 60 dnů po ozáření;
A — ozářené vzorky; B — neožářené vzorky

(v průměru 35%) rozpadu esenciálních aminokyselin. Tento rozpad podmiňuje úbytek proteinové složky, o čemž nás informuje zjišťovaný nárůst odpovídajícího množství volných amoniakálních bází ve srovná-

II. Obsah energetických a neenergetických živin, aminokyselin a hygienická úroveň sypké krmné směsi VETAVIT vystavené účinkům pronikavé radiace — Content of energetic and non-energetic nutrients, amino acids and hygienic level of the loose feed mixture VETAVIT, exposed to strong radiation

Sledovaný ukazatel	1		2		3	
	A	B	A	B	A	B
Sušina %	87,86	87,64	88,51	87,74	88,29	87,43
NL %	24,11	23,15	22,87	24,02	23,10	24,65
Tuk %	4,25	4,36	4,50	4,45	4,40	4,29
Popel %	6,77	6,77	6,78	6,57	6,56	6,93
Vláknina %	5,50	5,55	5,52	5,61	5,72	5,60
BNLV %	47,23	47,91	48,84	47,11	48,61	45,96
Ca g/kg	19,20	18,31	18,48	18,26	18,02	17,97
P g/kg	10,32	10,12	9,76	11,01	9,94	10,30
Mg g/kg	1,04	0,95	0,94	1,10	1,00	0,97
KVV mg/100 g	348,80	361,20	403,99	381,48	436,60	359,10
KT mg/g	103,10	106,40	130,04	112,18	135,04	110,67
Peroxidy	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Aldehydy	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Epihydrinaldehyd	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Amoniak mg/100 g	18,90	19,45	23,84	22,48	29,97	22,80
Lyzin %	1,13	1,09	1,07	—	1,04	1,06
Histidin %	0,45	0,47	0,43	—	0,41	0,42
Arginin %	1,37	1,31	1,28	—	1,27	1,29
Kyselina asparagová %	1,73	1,64	1,62	—	1,57	1,62
Threonin %	0,82	0,77	0,74	—	0,73	0,75
Serin %	1,05	0,93	0,99	—	0,90	0,92
Kyselina glutamová %	4,34	4,01	3,92	—	3,76	3,85
Prolin %	1,88	1,74	1,72	—	1,62	1,71
Glycin %	1,98	1,97	1,94	—	1,82	1,87
Alanin %	1,37	1,35	1,32	—	1,25	1,30
Valin %	1,05	1,04	0,98	—	0,97	0,98
Methionin %	0,38	0,38	0,38	—	0,36	0,37
Isoleucin %	0,74	0,69	0,69	—	0,67	0,66
Leucin %	1,55	1,54	1,53	—	1,48	1,51
Tyrosin %	0,60	0,55	0,56	—	0,34	0,50
Phenylalanin %	0,91	0,88	0,86	—	0,55	0,77

Legenda: 1 — ihned po ozáření; 2 — 30 dnů po ozáření; 3 — 60 dnů po ozáření;
A — ozářené vzorky; B — neozářené vzorky

ní s krmivý neozářenými. Zejména u masné konzervy je zaznamenáván rozpad bílkovin, a to s progresivním nárůstem v závislosti na čase. U sypké krmné směsi, v níž převážný podíl tvoří cereálie, je stupeň roz-

padu aminokyselin s průvodním růstem amoniakálního dusíku výrazně nižší. Námi prokázaný degradující vliv záření na hodnoty dusíkatých látek potvrzují Van Kooij (1979), Hansen (1966), Hartmuth-Hoene a Pautmann (1976). Eggum (1969, 1979) však signifikantní změny proteinu a jeho aminokyselin vlivem pronikavé radiace neprokázal.

Obdobné destrukční změny jsou patrné i u lipidové složky krmiv. Radiační vliv se zde uplatnil jako významný oxidační faktor, který rozkládá tuk a v procesu podobném žluknutí uvolňuje mastné kyseliny z glycerolové vazby. V tomto sledování se rovněž projevuje významná dynamická progresivní proměna v čase. Tyto výsledky plně korespondují s názory, které vyslovili Diehl (1970), Ford (1979) a Van Kooij (1979).

Jistý rozpad živin, ne však mimo hranice signifikance, vykazuje i sacharidový podíl sypké krmné směsi, vyjádřený kyselostí vodního výluhu. Radiolytické narušení polysacharidů tak, jak je popisují Mossel (1979) a Sandev a Kovrainov (1979), výsledky naší práce nepotvrzují.

Mikrobiologickým a mykologickým vyšetřením bylo zjištěno, že krmiva vystavená radiaci jsou zcela sterilní, bez nálezu jakékoliv mikroflóry. Stejný nálezný je i u tepelně opracovaných masových konzerv. U neozářených vzorků krmné směsi z doplňkových krmiv byl opakovaně prokazován výskyt zárodků *Pseudomonas aeruginosa*. Tato zjištění jsou srovnatelná se stanovisky dalších autorů, kteří se radiačním efektem na mikrobiální flóru potravin a krmiv zabývali (Kyzlink, 1980 a další).

Při organoleptickém vyšetření se ani u ozářených ani u neozářených krmiv (a to i ve vzestupné časové řadě) neobjevily odchylky od standardu. Lidskými smysly nebylo možné postřehnout stupeň kvalitativních změn, které byly prokázány chemickou analýzou a na něž pokusná zvířata reagovala svými senzorickými schopnostmi. Toto zjištění je poznatkem, který nepotvrzuje názor o výrazných změnách organoleptických, jak je u potravin popisuje Kyzlink (1980).

Z poznatků shromážděných v této práci je patrné, že ionizující záření zcela spolehlivě zabezpečuje mikrobiologickou a mykologickou asanaci krmiv rostlinného i živočišného původu. Vedle toho však přináší i některé negativní průvodní jevy, které spočívají v degradaci proteinové a lipidní oblasti krmiv. Rozsah poškození s sebou přináší zřejmě destrukční efekty i v oblastech vitamínové aktivity, jak nás o tom informují práce jiných autorů i některá dřívější vlastní sledování (Ford, 1979; Van Kooij, 1979; Diehl, 1970; Kyzlink, 1980; Dvořák, 1975, 1980).

Na základě našich zjištění je proto opodstatněné, aby ozářená krmiva byla používána podílově, aby tvořila pouze část denní krmné dávky, a to v kombinaci s krmivy, u kterých změny živin nejsou vykázané, spolu s biologickým opevněním přídatkem vitamínů a minerálních látek.

Literatura

ADAMIKER, D.: Practical experience with irradiation of laboratory animals feed. In: Decontamination of animal feeds by irradiation. Wien, International Atomic energy agency 1979.

- ČSN 46 7007. Výživná hodnota krmiv. 1967.
- ČSN 46 7011. Metody zkoušení zdravotní nezávadnosti krmiv. 1974.
- DIEHL, D. F.: Über die Wirkung ionisierende Strahlen auf den Vitamin E Gehalt von Lebensmitteln und auf reines Tokoferolacetat und Tokoferol. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 142, 1970, s. 1-7.
- DVOŘÁK, J.: Výzkum hygieny a technologie krmiv, výživy a krmení služebního psa ve vztahu k jeho racionálnímu využití v ozbrojených silách. [Závěrečná zpráva.] Brno, Vysoká škola veterinární 1975, s. 3-10.
- DVOŘÁK, J.: Výzkum výživy a krmení psů ve vztahu k fyziologické zátěži. [Závěrečná zpráva VÚ.] Brno, Vysoká škola veterinární 1980. 27 s.
- EGGUM, B. O.: Der Einfluss der Sterilisation auf die Proteinkvalität von Futtermischungen. Z. Tierphysiol Tierernähr. Futterm.-Kde, 25, 1969, s. 204.
- EGGUM, B. O.: Effect of radiation treatment on protein quality and vitamin content of animal feeds. Decontamination of animal feeds by irradiation. Wien, International Atomic energy agency 1979.
- FORD, P. J.: Influence of irradiation on protein and aminoacids in laboratory rodent diet. In: Decontamination of animal feeds by irradiation. Wien, International Atomic energy agency 1979.
- FORD, P. J.: Observation of the influence of irradiation on fat and vitamin A in dry laboratory cat diets. In: Decontamination of animal feeds by irradiation. Wien, International Atomic energy agency 1979.
- HANSEN, P. I. E.: Radiation treatment of meat products and animal by-products. Food irradiation. Symposium. Karlsruhe 1966.
- HARTMUTH-HOENE, A. E. — PAUTMANN, W.: Der Proteinnährwert von strahlensterilisierten Fischmehl. Z. Tierphysiol. Tierenähr. Futterm.-Kde, 36, 1976, s. 293.
- KYZLINK, V.: Základy konzervace potravin. Praha, SNTL 1980. 376 s.
- LEY, F. J.: Application of gamma radiation for the treatment of laboratory animal diets. In: Decontamination of animal feed by irradiation. Wien, International Atomic energy agency 1979.
- MOSSEL, P. A. A.: Rationals for the use of ionising radiation in the elimination of enteropathogenic bacteria from feeds. In: Decontamination of animal feeds by irradiation. Wien, International Atomic energy agency 1979.
- NADUVARI, I.: Experience of radiation treatment of laboratory and from animal feeds in Hungary. In: Decontamination of animal feeds by irradiation. Wien, International Atomic energy agency 1979.
- SANDEV, S. — KOVRAINOV, J.: The composition and digestibility of irradiation roughages. In: Decontamination of animal feeds by irradiation. Wien, International Atomic energy agency 1979.
- SICKEL, E.: Irradiated diet in routine use in conventionalisation of gnotobiotic piglets. In: Decontamination of animal feeds by irradiation. Wien, International Atomic energy agency 1979.
- SVOBODA, J.: Praktická cvičení v hygieně potravin. Praha, Státní pedagogické nakladatelství 1974. 338 s.
- VAN KOOIJ, J. G.: Chemical and biological evaluation of the nutritive value of heat sterilisation and rape appetized feed mixtures. In: Decontamination of animal feeds by irradiation. Wien, International Atomic energy agency 1979.
- VESELÝ, Z.: Praktika z technologie krmiv a výživy zvířat. Brno, Vysoká škola veterinární 1978. 269 s.

Došlo dne 16. 1. 1985

ДВОРЖАК, Й. — ШМИД, К. — ГРУШОВСКИ, Й. (Институт ветеринарии, Брно; Военный научно-исследовательский ветеринарный институт по усовершенствованию, Кошице): Влияние ионизирующего облучения на структурные изменения энергетических в кормах. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 629-636.

Для проверки влияния ионизирующего облучения прослеживали в течение 60 дней корма для собак (мясной комбикорм VETACAN и сыпучий VETAVIT), которые облучали Со 60 радиоизотопом интенсивностью 25 кГ/кг. Как установлено, общий объем энергических и неэнергических веществ не меняется, но их качественная структура свидетельствует о достоверном, около 35% распада эссенциальных аминокислот, убыли белков и нарастании свободных аммиачных баз. Проявляет себя значительное окисляющее влияние радиации на разложение жиров с высвобождением свободных жирных кислот из глицеринной уязки в процессе, подобном про-

горканию (с 13,3 — 20,88 — 37,10 мг/г у мясного и с 103,1 — 130,04 — 135,04 мг/г у сыпучего комбикормов). Некоторое разложение веществ в пределах значимости отмечено и у сахаридной доли сыпучего корма (VV 348,8 — 403,99 — 436,60 мг/100 г). Доказано, что радиостерилизация надежно обеспечивает микробиологическое и микологическое ассенизирование кормов, не вызывая улавливаемых человеческим осязанием изменений. Итак, ионизирующее облучение оказывает значительное антимикробное и антимикотическое действие. Но обуславливает и существенные структурные изменения энергетических веществ в кормах растительного и животного происхождения.

радиостерилизация; аминокислоты; протеины; липиды; сахараиды; микробиальный уровень; органолептические изменения

DVOŘÁK, J. — ŠMÍD, K. — HRUŠOVSKÝ, J. (University of Veterinary Medicine, Brno; Military Veterinary Extension and Research Institute, Košice): *The Effect of Ionizing Radiation on Structural Changes of Energetic Nutrients in Feeds*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 629-636.

For the purpose of testing the effect of ionizing radiation, feeds for dogs (meat feed mixture VETACAN and loose feed mixture VETAVIT) irradiated by ^{60}Co radioisotope at the dose of 25 kGy/kg were studied for 60 days. It has been found out that the total volume of energetic and non-energetic nutrients is not changed. Qualitative structure, however, displays a significant, on the average 35% disintegration of essential amino acids, decrease of proteins and increase of free ammoniac bases. A significant oxidation effect of radiation is exerted on the decomposition of fats with a release of free fatty acids from glycerol bond in a process similar to rancidification (from 13.3 — 20.88 — 37.10 mg/g in meat mixture, from 103.1 — 130.04 — 135.04 mg/g in loose mixture). A certain disintegration of nutrients, only within the limits of significance, occurred also in the saccharide proportion of the loose feed mixture (acidity of water extract 348.8 — 403.99 — 436.60 mg/100 g). It has been proved that radiosterilization reliably secures microbiological and mycological sanitation of feeds and causes no sensory changes noticeable by human senses. It follows from the results that ionizing radiation has a pronounced antimicrobial and antimycotic effectiveness. However, it causes significant structural changes of energetic nutrients in the feeds of animal as well as of vegetable origin.

radiosterilization; amino acids; proteins; lipids; saccharides; microbiological level; sensory changes

DVOŘÁK, J. — ŠMÍD, K. — HRUŠOVSKÝ, J. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno; Militärisches Forschungs- und Weiterbildungsinstitut für Veterinärmedizin, Košice): *Einfluß ionisierender Strahlung auf strukturelle Veränderungen der energetischen Nährstoffe in Futtermitteln*. Veter. Med. (Praha), 30, 1985 (10) : 629-636.

Zur Prüfung des Einflusses ionisierender Strahlung wurden im Laufe von 60 Tagen Futtermittel für Hunde (Fleischmischfutter VETACAN und das schütterte Mischfutter VETAVIT), die durch das Radioisotop ^{60}Co von 25 kGy/kg Intensität bestrahlt wurden, untersucht. Es wurde festgestellt, daß sich das Gesamtvolumen sowohl der energetischen als auch der nicht energetischen Nährstoffe keineswegs ändert. Die qualitative Struktur weist jedoch einen starken, im Durchschnitt 35 %igen Zerfall der essentiellen Aminosäuren, einen Rückgang der Eiweißstoffe und einen Anstieg der freien Ammoniakbasen auf. Eine bedeutsame Oxydationseinwirkung der Strahlung auf den Zerfall von Fett, mit einer Freisetzung von Fettsäuren aus den Glycerinbindungen in einem dem Ranzigwerden analogen Prozeß (aus 13,3 — 20,88 — 37,10 mg/g bei der Fleischmischung, aus 103,1 — 130,04 — 135,04 mg/g bei der schütterten Mischung) macht sich geltend. Ein gewisser Nährstoffzerfall, jedoch in den Signifikanzgrenzen, kam auch im Sacharidanteil des schütterten Gemisches zum Ausdruck (KVV 348,8 — 403,99 — 436,60 mg/100 g). Es wurde nachgewiesen, daß eine Radiosterilisation eine mikrobiologische sowie mykologische Assanation von Futtermitteln verläßlich gewährleistet und keine, durch die menschlichen Sinne erfassbaren sensorischen Veränderungen hervorruft. Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die ionisierende Strahlung eine ausgeprägte anti-

mikrobielle sowie mykotische Wirkung aufweis. Sie bedingt jedoch bedeutsame strukturelle Veränderungen der energetischen Nährstoffe der Futtermittel u. zw. sowohl tierischer als auch pflanzlicher Herkunft.

Radiosterilisierung; Aminosäuren; Proteine; Lipide; Sacharide; mikrobiologisches Niveau; organoleptische Veränderungen

Adresy autorů:

Doc. MVDr. Jiří Dvořák, CSc., MVDr. Karel Šmíd, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

Prof. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., Vojenský veterinárny doškoľovací výskumný ústav, Kukučínova 2, 040 00 Košice

RYBÍ BUNĚČNÉ LINIE, JEJICH KULTIVACE A VYUŽITÍ

K širokému spektru buněčných kultur používaných dnes ve virologii přibyla v poslední době celá řada linií připravených z ryb a dalších poikilotermních živočichů. Tato část živočišné říše, v níž ryby, plazi a obojživelníci představují 73 % všech druhů obratlovců (Ahne, 1979a) a ryby samotné pak zhruba 56 % (Reichenbach-Klinke, 1980), byla doposud z hlediska studia infekčních chorob do značné míry opomíjena.

Současný bouřlivý rozvoj a využívání rybích buněčných linií byl podnícen jednak rostoucí intenzifikací chovu některých užitkových ryb a potřebou důsledného sledování jejich zdravotního stavu, jednak vhodností těchto buněčných kultur k toxikologickým studiím, určení fylogenetických rozdílů buněčného metabolismu apod. (Wolf a Mann, 1980).

Z virových chorob, které v současné době ohrožují naše chovy ryb, vystupují do popředí tyto tři infekce:

a) jarní virémie kaprů (JVK), jejímž původcem je virus ze skupiny rhabdovirů;

b) infekční nekróza pankreatu (IPN), postihující zejména pstruhy, ale vyskytující se i u dalších lososovitých ryb. Původcem je virus obsahující dvouvláknitou RNK, zařazovaný v současné době mezi birnaviry;

c) virová hemoragická septicémie (VHS), onemocnění lososovitých ryb, vyvolané RNK virem ze skupiny rhabdovirů.

Ke studiu a diagnostice virových chorob jsme získali z Ústavu zoologie a hydrobiologie Univerzity v Mnichově od prof. Ahneho tyto linie rybích buněčných kultur:

FHM — buněčná linie z kaudální části trupu střevle, *Pimephales promelas* (Grawell a Malsberger, 1965);

RTG-2 — buněčná linie z varlat pstruha duhového, *Salmo gairdneri* (Wolf a Quimby, 1962);

PG — buněčná linie z gonád štiky, *Esox lucius* (Ahne, 1979b);

CHSE — buněčná linie z embryonálních buněk lososa, *Onchorhynchus tshawytscha* (Fryer aj., 1965).

První dvě z uvedených buněčných kultur se nám později podařilo získat i z Americké sbírky tkáňových kultur (ATCC). Zatímco buněčné linie pocházející z NSR byly převzaty přímo z diagnostického pracoviště bez bližšího určení, byly referenční kultury přesně definovány. Epiteliální linie FHM v 78. pasáži a fibroblastoidní linie RTG-2 v 61. pasáži byly prosté kontaminujících virů a mikoplazmat.

Při pasážování linií rybích buněk se nám osvědčila stejná technika práce jako u savčích buněk. Pouze referenční linie bylo nutné převést z mechanického způsobu uvolňování buněk na enzymatický. Po určité adaptaci byly tyto kultury, stejně jako ostatní, pasážovány 0,15% až 0,20% roztokem trypsinu v 0,02% verzenu.

Při testování různých druhů médií bylo nejlepších výsledků dosaženo kultivací buněčných linií v médiu Eagle-MEM (ÚSOL Praha), doplněném 10 % fetálního bovinního séra s přidáním 100 m. j. penicilinu a 100 µg streptomycinu na mililitr. Na rozdíl od savčích buněk měly rybí linie specifické požadavky na vlastnosti kultivačních sér. V našich podmínkách běžně dostupná inaktivovaná telecí séra působila na linie silně cytotoxicky, přičemž negativní vliv séra se zvyšoval s počtem subpasáží. Ke kultivaci se však hodila většina bovinních fetálních sér i sér prekolostálních. Při použití prověřených bovinních sér byla růstová aktivita kultur i jejich údržnost velmi dobrá, takže kultury přesazované v poměru 1 : 2—3 dosahovaly kompletní monolayer již za 24 až 48 hodin po nasazení a přežívaly bez výměny média po dobu 14 až 20 dnů.

Ve srovnání s liniemi savčích buněk byly kultury rybích buněk vnímavější na kvalitu kultivačního skla, která významně ovlivňovala rychlost adheze buněk a jejich růstovou aktivitu.

Největší rozdíl mezi buňkami ryb a savců či ptáků je v požadavcích na teplotu. Zatímco buněčnou linii FHM bylo možné kultivovat při teplotě až do 26 °C, tedy téměř po celý rok při pokojové teplotě, vyžadovaly linie RTG-2, PG a CHSE teplotu v rozmezí 15 až 20 °C. Tyto linie byly na zvýšenou teplotu natolik citlivé, že jim v létě škodil i delší pobyt v laboratoři, zejména v Hansenově skříni s hřícím kahanem. Buňky FHM přežívaly zvýšené letní teploty většinou bez úhony.

K dlouhodobému uchovávání rybích buněčných linií se nám osvědčilo ponechat kultury v Rouxových lahvích s udržovacím médiem (Eagle-MEM s 1 % bovinního fetálního séra) v lednici při teplotě +4 °C. Buňky takto přežívají čtyři i více měsíců a zachovávají si svoji růstovou aktivitu.

Na základě uvedených zkušeností se domníváme, že při dodržení stanovených kultivačních podmínek lze i u rybích linií dosahovat standardních výsledků a úspěšně jich využívat v diagnostice virových chorob ryb. Svědčí o tom i mnoho našich izolací viru infekční nekrózy pankreatu u pstruhů a znovu potvrzený výskyt jarní virémie u kaprů (Pospíšil aj., 1984, 1986).

MVDr. Zdeněk Pospíšil, CSc., ing. Marie Machatková
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

Literatura

- AHNE, W.: A survey of viruses occurring in poikilotherm vertebrates. *Anim. Res. Dev.*, 9, 1979a, s. 24-34.
- AHNE, W.: Fish cell culture: a fibroblastic line (PG) from ovaries of juvenile pike (*Esox lucius*). *In vitro*, 15, 1979b, s. 839-840.
- FRYER, J. L. — YUSHA, A. — PILCHER, K. S.: The *in vitro* cultivation of tissue and cells of *Pacific salmon* and steelhead trout. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 126, 1965, s. 566.
- GRAVELL, M. — MALSBERGER, R. G.: A permanent cell line from the fethead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 126, 1965, s. 555-556.
- POSPÍŠIL, Z. — TOMÁNEK, J. — VALÍČEK, L. — ZENDULKOVÁ, D.: Izolace a identifikace viru infekční nekrózy pankreatu pstruhů. *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986 (v tisku).
- POSPÍŠIL, Z. — TOMÁNEK, J. — VALÍČEK, L. — ZENDULKOVÁ, D. — SVOBODA, I. — CHLUPOVÁ, L.: Virologická diagnostika infekčních chorob ryb. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1984. 35 s.
- REICHENBACH-KLINKE, H. H.: Krankheiten und Schädigungen der Fische. Stuttgart — New York, G. Fischer Verlag 1980. 472 s.
- WOLF, K. — MANN, J.: Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. *In Vitro*, 16, 1980, s. 166-179.
- WOLF, K. — QUIMBY, M. C.: Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science*, 135, 1962, s. 1065-1070.
- WOLF, K. — QUIMBY, M. C.: Salmonid viruses: infectious pancreatic necrosis verius. *Arch. ges. Virusforsch.*, 34, 1971, s. 144-156.

Došlo dne 23. 5. 1985

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky a současný stav v dané oblasti.

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být připojen souhlas vedoucího pracoviště s publikací článku a prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění prací rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě prací.

Jednotlivé práce nemají přesáhnout rozsah 10 až 12 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI (ČSN 01 1303).

Technická úprava rukopisu

Úprava rukopisu má odpovídat státní normě ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojité mezeru). Ilustrace, grafy, tabulky a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na zadní straně se vyznačí tužkou pořadové číslo obrázku nebo grafu a napíše se jméno autora článku. Texty k obrázkům a grafům se dodávají na zvláštním listě, umístění se označuje na levém okraji příslušné strany rukopisu číslicí v kroužku. Tabulky se číslují zvlášť římskými číslicemi.

Vlastní úprava práce

Název práce (titul) nemá přesahovat 85 úhozů. Je nutné vyvarovat se v názvu obecných frází jako: Studie o... Příspěvek k... Pokus o..., každý zaslaný článek musí být samostatnou prací, nemohou být publikovány články na pokračování, označené např.: Studie o... I., II., III., atd., stejně tak jsou vyloučeny podtitulky článků.

Jména autorů se uvádějí bez titulů s počátečním písmenem jména.

Souhrn — Vypracování souhrnu je nutné věnovat obzvláštní péči. Autor do něho má shrnout vše, co je na jeho práci pozoruhodné a nové a co má být dokumentováno. Souhrn má být nekritickým informačním výběrem významného obsahu a závěru článku, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, nemá ji však nahradit. Nesmí překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl psán celými větami a ne telegrafickým způsobem. Souhrn začíná jménem autorů, adresou pracoviště, titulem článku a citací časopisu.

Klíčová slova (Key words, index terms) — Připojují se po vynechání řádku pod souhrn. Klíčovým slovem rozumíme substantivum, které je nutné pro věcné zařazení předložené práce. Klíčová slova se

řadí směrem od obecnějších výrazů ke konkrétním. Začínají malým písmenem a oddělují se středníkem. Jejich počet závisí na povaze práce a neměl by klesnout pod tři a převýšit dvanáct slov.

Úvod — Má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce uskutečněna, a velmi stručnou formou stav studované otázky. Je nutno se v něm vyhnout rozsáhlým historickým přehledům. Uvádí se bez nadpisu, je možné v něm uvést k práci se vztahující autory, přičemž se doporučuje co nejnížší počet autorů.

Materiál a metody — Metody se popisují pouze tehdy, jsou-li původní, jinak postačuje citovat autora metod a uvádět jen případné odchylky. Je v nich popsán pokusný materiál. Popis metod by měl umožnit, aby kdokoli z odborníků mohl podle něho a při použití uvedených citací práci opakovat.

Výsledky — Doporučuje se nepoužívat k vyjádření kvantitativních stavů tabulek a dát přednost grafům, anebo tabulky shrnout v statistickém hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse — obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostacích a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, kteří mají k publikované práci bližší vztah), pokud mají souvislost nebo jsou s předloženou prací nějak srovnatelné.

Literatura — Musí odpovídat státní normě ČSN 01 0197, tj. citace seřadit abecedně podle jména prvních autorů; příjmení (verzálkami); zkratka jména (dvojtečka); plný název práce (tečka); úřední značka časopisu, ročník, rok vydání, číslo, první stránka — poslední stránka (před číslo se uvádí zkratka č. a před první stránku s.); u knih je uvedeno místo vydání, vydavatel a rok. Odkazy na literaturu v textu jsou uvedeny jménem autora (čárka) a rokem vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu.

Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vypsány, aby se předešlo omylům při překladech. V názvu práce a v souhrnu je lépe zkratky nepoužívat.

Na zvláštním listě uvede autor plné jméno (i u spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSČ.

Holý L., Jiříček A., Žák M., Čapeková M., Dvořáková V., Lopatářová M.: Využití rychlého způsobu kryokonzervace embryí skotu při nekrvavém přenosu v transplantační praxi	577
Kyllar V., Ryjáček J., Šterc J., Čech S.: Výskyt a léčba <i>dermatitis digitalis</i> u dojníc	585
Halagan J., Arendarčík J., Molnárová M., Staníková A.: Histomorfologické zmeny folikulárneho aparátu vaječníkov bahníc po ožiarení	595
Černík K., Tůmová B., Kamiňský B., Rajtár V.: Sérologický důkaz výskytu aviárních paramyxovirů u holubů	603
Štěrba F., Zámek L., Halačková M., Kraclíková V.: Vývoj morfológických změn a protilátkové odezvy morčat experimentálně infikovaných bakteriemi <i>Brucella suis</i> , biotyp 2	611
Dvořák J., Šmíd K., Hrušovský J.: Vliv ionizujícího záření na strukturální změny energetických živin v krmivech	629
Krátké sdělení	
Pospíšil Z., Machatková M.: Rybí buněčné linie, jejich kultivace a využití	637

СОДЕРЖАНИЕ

Голы Л., Йиржичек А., Жак М., Чапекова М., Дворжакова В. Лопатржова М.: Применение скоростного способа криоконсервирования эмбрионов крупного рогатого скота при бескровной пересадке в практике трансплантации	577
Киллар В., Рыхачек Й., Штерц Я., Чех С.: Распространение и лечение <i>dermatitis digitalis</i> у коров	585
Халаган Ю., Арендарчик Й., Молнарова М., Станикова А.: Гистоморфологические изменения фолликулярного аппарата яичников у овцематок после облучения	595
Черник К., Тумова Б., Каминьский Б., Райтар В.: Серологическое доказательство наличия авиарных парамиксовирусов у голубей	603
Штерба Ф., Замек Л., Галачкова М., Крацликова В.: Динамика морфоизменений и реакции антител у морских свинок, экспериментально зараженных бактериями <i>Brucella suis</i> , биотип 2	611
Дворжак Й., Шмид К., Грушовски Й.: Влияние ионизирующего облучения на структурные изменения энергетических веществ в кормах	629

CONTENTS

Holý L., Jiříček A., Žák M., Čapeková M., Dvořáková V., Lopatářová M.: The Use of a Rapid Method of Cryopreservation of Bovine Embryos for Non-Surgical Embryo Transfer	577
Kyllar V., Ryjáček J., Šterc J., Čech S.: Occurrence and Treatment of <i>Dermatitis Digitalis</i> in Dairy Cows	585
Halagan J., Arendarčík J., Molnárová M., Staníková A.: Histomorphological Changes in the Follicular Apparatus of Ewes' Ovaries after Irradiation	595
Černík K., Tůmová B., Kamiňský B., Rajtár V.: Serological Demonstration of the Prevalence of Avian Paramyxoviruses in Pigeons	603

- Štěrba F., Zámek L., Halačková M., Kraclíková V.: The Development of Morphological Changes and Antibody Response in Guinea Pigs Infected Experimentally with the Bacteria *Brucella suis*, Biotyp 2 . . . 611
- Dvořák J., Šmíd K., Hrušovský J.: The Effect of Ionizing Radiation on Structural Changes of Energetic Nutrients in Feeds . . . 629

INHALT

- Holý L., Jiříček A., Žák M., Čapeková M., Dvořáková V., Lopatářová M.: Anwendung einer raschen Methode der Kryokonservierung von Rinderembryonen bei nicht chirurgischem Transfer in der Transplantationspraxis . . . 577
- Kyllar V., Ryjáček J., Šterc J., Čech S.: Auftreten und Behandlung von *Dermatitis digitalis* bei Milchkühen . . . 585
- Halagan J., Arendarčík J., Molnářová M., Staníková A.: Histomorphologische Veränderungen des Follikularapparats der Eierstöcke von Mutterschafen nach Bestrahlung . . . 595
- Černík K., Tůmová B., Kamiňský B., Rajtár V.: Serologischer Nachweis des Auftretens aviärer Paramyxoviren bei Tauben . . . 603
- Štěrba F., Zámek L., Halačková M., Kraclíková V.: Entwicklung morphologischer Veränderungen sowie Antikörperreaktionen von mit Bakterien *Brucella suis*, Biotyp 2, experimentell infizierten Meerschweinchen . . . 611
- Dvořák J., Šmíd K., Hrušovský J.: Einfluß ionisierender Strahlung auf strukturelle Veränderungen der energetischen Nährstoffe in Futtermitteln . . . 629

Rukopisy odevzdány k tisku 28. 6. 1985 — Podepsáno k tisku 24. 9. 1985

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