

VĚDECKÝ ČASOPIS



# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

7

PRAHA  
ROČNÍK 31 (LIX)  
ČERVENEC 1986  
CENA 10 Kčs  
CS ISSN 0590-5214

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ  
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ  
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

## Vědecký časopis

### 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 1986

■  
Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje stu-  
die, rozbor 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 об-  
зоры, анализы и научные статьи о решенных заданиях по  
научному исследованию в области ветеринарии. Издает Че-  
хословацкая сельскохозяйственная академия — Институт на-  
учно-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.

# IMUNOENZYMATICKÝ PRŮKAZ VIRU ENZOOTICKÉ LEUKÓZY SKOTU (BLV) V BUNĚČNÝCH KULTURÁCH

B. Hofírek, M. Granátová, P. Hořín, V. Mádr, V. Pleva

---

HOFÍREK, B. — GRANÁTOVÁ, M. — HOŘÍN, P. — MÁDR, V. — PLEVA, V. (Vysoká škola veterinární, Brno; Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Imunoenzymatický průkaz viru enzootické leukózy skotu (BLV) v buněčných kulturách*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 385-392.

V práci je popsána metodika provedení imunoenzymatického testu při průkazu viru enzootické leukózy skotu (BLV) na buňkách fetální jehněčí sleziny (FLS) trvale produkujících BLV a v lymfocytech infikovaných zvířat. V obou případech, jak v buňkách FLS, tak i v lymfocytech, byl BLV prokázán imunoperoxidázovým testem. Pomocí definovaných sér získaných od zvířat po experimentální i přirozené infekci byl BLV zmíněným testem prokázán v buňkách FLS ve všech případech, kdy byla použita pozitivní séra s anti-BLV protilátkami. Tím byla prokázána i specifita prokazovaných protilátek. Analogicky byl prokázán BLV v lymfocytech infikovaných zvířat, u nichž byla doba infekce přesně definována. Metoda imunoperoxidázového testu na lymfocytech je doporučována v indikovaných případech k průkazu BLV u infikovaných zvířat.

virus bovinní leukózy; lymfocyty; imunoperoxidázový test

---

V souvislosti s programem tlumení enzootické leukózy skotu je mimořádná pozornost věnována diagnostice této závažné enzootie. Z praktického hlediska stojí v popředí zájmu pochopitelně metody průkazu protilátek proti BLV imunodifúzním testem (Hofírek a Vařejka, 1978), séroneutralizačním testem (Závada aj., 1979) nebo ELISA a RIA metodami (Franz aj., 1984, 1985). Tlumení tak závažné nákazy, jakou je enzootická leukóza, ovšem vyžaduje i další diagnostické metody, které umožňují přímý průkaz BLV. Ani studium patogeneze se bez těchto metod neobejde. Za určitých okolností je v konkrétních případech důležité vědět, zda zvíře s prokázanými protilátkami je také nosičem viru.

V naší domácí literatuře byla až dosud věnována podstatně menší pozornost přímým metodám průkazu BLV než metodám prokazujícím protilátky. Dílčí výsledky byly publikovány o elektronoskopickém průkazu (Valíček aj., 1985), o důkazu syncytiálním testem (Bobáková aj., 1985) a konečně práce prokazující aktivitu reverzní transkriptázy (Altaner a Černý, 1977).

V naší práci zaměřujeme pozornost na imunoenzymatický průkaz BLV v kulturách virusprodukcujících FLS buněk a dále v lymfocytech experimentálně i přirozeně infikovaných zvířat BLV. Vedle metodické stránky věci jsme dále srovnávali výsledky imunoenzymatického průka-

zu BLV s výsledky průkazu anti-BLV protilátek a jejich specifity. Ve svém celku chce práce ověřit vhodnost tohoto způsobu přímého průkazu BLV pro praxi. Náš zájem o tuto metodu byl obzvláště motivován skutečností, že při průkazu anti-BLV protilátek se použití imunoenzymatických metod (ELISA) ukázalo jako velmi perspektivní (Macura aj., 1984; Franz aj., 1984; Hofírek aj., 1985).

## MATERIÁL A METODA

Celý náš experiment se skládal ze tří samostatných pokusů:

V prvním pokusu jsme pomocí definovaných sér prováděli průkaz BLV v buněčné linii FLS buněk (klon G I/II) imunoperoxidázovým testem. Hovězí séra potřebná pro tento průkaz (pozitivní i negativní) jsme získali od skupiny 30 pokusných býků (černostrakatého nížinného plemene, šest měsíců starých), z nichž 23 bylo různým způsobem experimentálně infikováno (intraperitoneálně lymfocyty, spermatem sérologicky pozitivních býků, děložními výplasky sérologicky pozitivních krav) a zbylých sedm bylo ponecháno jako kontrola, aniž byli od ostatních izolováni. Všechna pokusná zvířata byla sérologicky sledována v měsíčních intervalech třemi metodami (imunodifúzní, séroneutralizační a ELISA), dvakrát před infekcí a šestkrát po experimentální infekci. Za šest měsíců po experimentální infekci byla odebrána krev a získaná séra byla použita v imunoperoxidázovém testu.

Ve druhém pokuse jsme obdobně provedli imunoperoxidázový test na FLS buňkách, přičemž jsme použili 36 sér od jaloviček (převážně kříženky dánského červeného skotu a černostrakatého nížinného plemene s českým strakatým plemenem). Rovněž část těchto zvířat (26 jaloviček šest měsíců starých) byla experimentálně infikována (intraperitoneálně lymfocyty, plazma sérologicky a virologicky pozitivních donorů; intrauterinně plazma a lymfocyty pozitivních donorů). Zbývajících deset zvířat bylo ponecháno jako kontroly bez izolace od experimentálně infikovaných. Celá tato skupina jaloviček byla obdobně jako v předcházejícím experimentu pravidelně sérologicky kontrolována na průkaz anti-BLV protilátek třemi metodami (ID, PsNT a ELISA). Vyšetřovali jsme zpravidla v týdenních a dvoutýdenních intervalech. Ve 12. měsíci pokusu byla odebrána krev a získané sérum bylo použito v imunoperoxidázovém testu jako v předcházejících pokusech.

Ve třetím pokuse, ve kterém jsme použili imunoperoxidázový test na izolovaných a krátkodobě kultivovaných lymfocytech, bylo zařazeno šest zvířat, z toho tři pozitivní a tři negativní na průkaz anti-BLV protilátek. Z pozitivních zvířat šlo v jednom případě o perzistující lymfocytózu, ve druhém o sérologicky pozitivní zvíře (PsNT testem) a ve třetím případě o experimentálně infikovanou dojnici (intraperitoneálně lymfocyty). Těchto šest zvířat, která byla zdrojem lymfocytů pro imunoperoxidázový test, bylo současně kontrolováno elektronoskopicky. Potřebná pozitivní a negativní séra pro tuto reakci jsme získali ze soupravy ELISA pro diagnostiku leukózy z n. p. Bioveta na Hané.

## METODIKA PROVEDENÍ IMUNOENZYMATICKÉHO-IMUNOPEROXIDÁZOVÉHO TESTU (IET) NA BUŇKÁCH FLS

Buňky FLS, klon G I/II (buněčná linie odvozená z buněk fetální jehněčí sleziny, která byla infikována virem BLV a trvale jej produkuje), byly inkubovány v množství  $2 \times 10^6$  ml na Petriho miskách o průměru 10 cm, na jejichž dno byla vložena sklička o rozměrech  $1,2 \times 1,2$  cm. Buňky FLS byly kultivovány v médiu MEM (EAGLE) TM SEVAC VI, doplněném 5% fetálního telecího séra (FCS) při teplotě  $37^\circ\text{C}$  v atmosféře s 5% kyslíčniku uhličitého. Po čtyřech dnech se na skličkách vytvořil buněčný monolayer, který byl po usušení fixován deset minut acetonem, sklička byla použita buď ihned, nebo byla uchována při teplotě  $-20^\circ\text{C}$ .

Sklička s fixovaným monolayerem buněk FLS byla dvakrát opláchnuta 0,1 mol roztokem TRIS HCl pufru pH 7,6. Používané vzorky v testu vyšetřovaných sér byly naředěny TRIS HCl pufrům v poměru 1:2 a nanášeny na usušená sklička. Po 45 minutách byla sklička pětikrát opláchnuta roztokem TRIS HCl pufru a na jejich povrch byly nanášeny křenuvou peroxidázou značené protilátky proti hovězímu

imunoglobulinu SwAB (Px — ÚSOL Praha), ředěné v poměru 1:10 TRIS HCl puforem. Po třech hodinách byla sklička opět důkladně promyta TRIS HCl puforem a potom byl nanesen na 15 minut 0,075% roztok 3,3'-diaminobenzidintetrahydrochlorid s 0,001%  $H_2O_2$ . Po 15 minutách jsme sklička opět promyli.

Jestliže se na monolayer buněk FLS navrství pozitivní sérum, přítomné anti-BLV protilátky se naváží na ty části buněk FLS, ve kterých je přítomen virový antigen BLV; po imunoperoxidázovém testu se tato místa vybarví tmavohnědě. Buňky bez virového antigenu nebo buňky, na které byl nanesen negativní vzorek séra bez anti-BLV protilátek, zůstávají zbarveny světle hnědě.

Jako kontrolní pozitivní a negativní séra jsme použili séra ze soupravy ELISA pro diagnostiku leukózy skotu z n. p. Bioveta, Ivanovice na Hané. Jako negativní kontrola bylo použito médium MEM, ředěné roztokem TRIS HCl pufru v poměru 1:2.

## METODIKA PROVEDENÍ IMUNOENZYMATICKÉHO-IMUNOPEROXIDÁZOVÉHO TESTU (IET) NA LYMFOCYTECH

Lymfocyty byly separovány z heparinované krve (10 jednotek na 1 ml krve). Takto ošetřená krev byla odstředována 30 minut při 1200 otáčkách za minutu. Vzniklý buffy-coat bílých krvinek byl odsát ze zkumavek Pasteurovou pipetou a ředěn v poměru 1:2 fyziologickým roztokem.

Těsně před použitím byl připraven 17% roztok verografinu, po 4 ml rozpipeťován do zkumavek a ve stejném množství byl opatrně navrstven naředěný buffy-coat. Po centrifugaci 45 minut při 1600 otáčkách za minutu byl odsát prstenec lymfocytů, který se vytvořil mezi vrstvou verografinu a plazmy. Lymfocyty byly potom dvakrát promyty fyziologickým roztokem (vždy po resuspendování byly odstředěny 10 minut při 1000 otáčkách za minutu), potom byly resuspendovány v množství  $5 \times 10^6$ /ml v médiu RPMI 1640 s 10 % FCS (fetal calf serum).

Kultivace probíhala na skličkách o rozměrech  $1,2 \times 1,2$  cm, vložených v Petriho miskách o průměru 6 cm, v médiu 1640 s 10 % FCS a s  $4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$   $\beta$ -merkaptopetanolu.  $\beta$ -merkaptopetanol je použit jako nespecifický mitogen hematopoetických buněk. Po 72 hodinách kultivace byla sklička z Petriho misek vyňata, opatrně opláchnuta fyziologickým roztokem, usušena a po desetiminutové fixaci acetonem byl proveden imunoperoxidázový test obdobně jako s kulturou FLS buněk. Lymfocyty z BLV pozitivních zvířat, které nesly virový antigen, se barvily intenzivně hnědou barvou, ostatní lymfocyty nebo lymfocyty z negativních vzorků zůstávaly světle hnědé.

Obdobně jako v předcházejícím imunoperoxidázovém testu provedeném na FLS buňkách, i v tomto případě jsme jako kontrolní pozitivní a negativní séra použili sér ze soupravy ELISA z n. p. Bioveta, Ivanovice na Hané. Kontrolní negativní lymfocyty byly získány ze zdravých zvířat, chovaných na katedře diagnostiky, terapie a prevence VŠV.

Hematologickou diagnostiku jsme dělali na automatickém počítači krevních částic Coulter-Counter a výsledky jsme hodnotili podle leukózního klíče.

Výsledky imunoenzymatického testu na lymfocytech a průkaz BLV byl kontrolován elektronovou mikroskopií. Použili jsme metodiky rastrovací elektronové mikroskopie (VÚVeL Brno). Suspenze propraných leukocytů, rozprostřená na kouscích podložních sklíček, byla za vlhka fixována 3% glutaraldehydem; po oprání vodou byla sklíčka s fixovanými leukocyty odvozněna stoupající řadou alkoholů a 100% acetonem. Po dvojím proprání v tekutém kyslíčnicku uhlíčitým byly buňky sušeny v kritickém bodě v přístroji POLARON E 3000. Po pokovení zlatem v napařovacím přístroji POLARON E 5100 byly vzorky prohlíženy a fotografovány rastrovacím elektronovým mikroskopem TESLA BS 300.

## VÝSLEDKY

Výsledky prvního pokusu našeho experimentu zachycuje tab. I. V testu jsme použili séra od 30 býků rok starých, kteří byli v šesti měsících věku různým způsobem experimentálně infikováni. Sérologicky byly prokázány anti-BLV protilátky u deseti z těchto zvířat všemi použitými metodami (ID, ELISA, PsNT). Šlo o býky, kteří byli infiko-

I. Výsledky imunoperoxidázového testu na buňkách FLS při použití imunologicky definovaných sér 30 býků — The results of immunoperoxidase test on FLS cells when immunologically defined serums of 30 bulls were used

| Celkový počet vyšetření (sér) | Výsledek sérologického vyšetření<br>— počet zvířat s anti-BLV<br>protilátkami (ID, ELISA, PsNT) | Výsledek imunoenzymatického<br>testu na FLS buňkách |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 30                            | 10 pozitivních<br>20 negativních                                                                | 10 pozitivních<br>20 negativních                    |

vání různými dávkami lymfocytů ( $4 \times 10^5$  —  $6 \times 10^6$ ). Všechna ostatní zvířata, intikovaná spermatem, plazmou i děložními výplasky, zůstala bez protilátkové odpovědi.

Výsledky tohoto pokusu ukázaly plný souhlas mezi výsledkem sérologických vyšetření a výsledkem imunoenzymatické reakce na FLS buňkách. To znamená, že všemi séry pozitivních zvířat byl prokázán na FLS buňkách BLV a naopak, při použití sér negativních zvířat BLV prokázán nebyl.

Ve druhém obdobném pokuse našeho experimentu, ve kterém byla pro imunoenzymatický test použita séra od 36 jaloviček, jsme získali výsledky, které jsme shrnuli do tab. II.

Z 26 experimentálně infikovaných jaloviček bylo v době provedení imunoenzymatického testu 17 kusů pozitivních (protilátky byly prokázány všemi metodami — PsNT, ELISA, ID) a devět kusů negativních. U ostatních deseti zvířat vystavených kontaktní infekci byly tři kusy sérologicky pozitivní všemi metodami a pět bylo negativních. Ve dvou případech byla zjištěna dubiózní reakce séroneutralizačním testem. Vyšetření ID a ELISA testy bylo v těchto případech negativní.

V našich pokusech jsme provedli také imunoperoxidázový test na lymfocytech (obr. 1). V tomto pokuse byly použity lymfocyty od cílevědomě vybraných zvířat. Výsledek sérologického a imunoenzymatického vyšetření byl kontrolován i elektromikroskopickým vyšetřením. Výsledky jsou shrnuty do tab. III.

II. Výsledek imunoperoxidázového testu na buňkách FLS při použití imunologicky definovaných sér 36 jaloviček — The result of immunoperoxidase test on FLS cells when immunologically defined serums of 36 heifers were used

| Celkový počet vyšetřených sér  | Průkaz protilátek<br>(ID, ELISA, PsNT)    | Výsledek imunoenzymatického<br>testu (IET) na FLS buňkách |
|--------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 26<br>(experimentální infekce) | 17 pozitivních<br>9 negativních           | 17 pozitivních<br>9 negativních                           |
| 10<br>(kontaktní infekce)      | 3 pozitivní<br>2 dubiózní*<br>5 negativní | 3 pozitivní<br>2 negativní<br>5 negativní                 |

\* sérologicky pozitivní jen PsNT testem, vyšetření ID a ELISA testy negativní

1. Výsledek imunoperoxidázového testu na lymfocytech z krátkodobé kultury; na sklíčku lymfocyty fixované acetonem; skupina tmavě zbarvených lymfocytů = pozitivní reakce (průkaz BLV); světle zbarvené lymfocyty = negativní reakce; zvětšení cca 500X — The result of immunoperoxidase test on lymphocytes from a short-time culture. On the slide: lymphocytes fixed by acetone; a group of dark-coloured lymphocytes = positive reaction (BLV detected); light-coloured lymphocytes = negative reaction. Magnif. about 500 times



III. Výsledky imunoperoxidázového testu na lymfocytech od imunologicky definovaných zvířat — The results of immunoperoxidase test on lymphocytes of immunologically defined animals

| Pokusné zvíře číslo | Výsledek sérologického a hematologického vyšetření                                                                  | Výsledek imunoenzymatického testu                          | Výsledek elektronoskopického vyšetření |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 8 (dojnice)         | dlouhodobý sérologický i hematologický reagent — evidován 5 roků — přirozená infekce                                | +                                                          | +                                      |
| 6 (jalovice)        | krátkodobý sérologický reagent — 1 rok po experimentální infekci                                                    | +                                                          | +                                      |
| 3M (dojnice)        | experimentálně infikovaná 1 ml krve <i>i. per.</i> pozitivního donora<br>sérologicky pozitivní po infekci za 20 dnů | 1. vyšetření za 20 dnů<br>+<br>2. vyšetření za 41 dnů<br>+ | +<br><br>+                             |
| 2 (dojnice)         | sérologicky negativní                                                                                               | —                                                          | —                                      |
| 3 (dojnice)         | sérologicky negativní                                                                                               | —                                                          | —                                      |
| 10M (dojnice)       | sérologicky negativní                                                                                               | —                                                          | —                                      |

Výsledek elektronoskopického vyšetření:

+ = povrch lymfocytů je hluboce zbrázděný, popřípadě jsou patrné husté protáhlé výběžky  
— = povrch lymfocytů je rozbrázděn jen mělce, popř. je povrch téměř hladký

V poslední době jsme svědky neobyčejného rozvoje enzymových imunoanalytických metod, které se ve veterinární medicíně uplatňují především na úseku průkazu protilátek. Enzootická leukóza skotu patří mezi první infekční onemocnění, u kterých byla v rutinní diagnostice uplatněna nepřímá imunoanalytická metoda ELISA k průkazu anti-BLV protilátek (Altaner aj., 1982; Franz aj., 1984; Hofírek aj., 1985). Tato skutečnost přímo nabízí využít enzymové imunoanalýzy v některé z možných modifikací, které tato diagnostická metoda umožňuje.

Program tlumení enzootické leukózy skotu, jakož i studia některých problémů patogeneze tohoto onemocnění, si vyžádala propracování vhodné metody, která by umožňovala pohotový průkaz BLV. Virus enzootické leukózy skotu (BLV) lze prokázat různými metodami, z nichž je možné použít elektronové mikroskopie (Lešník a Vrtiak, 1984; Valíček aj., 1985), revertázového testu (Rössler aj., 1980) nebo syncytiálního testu (Liebermann aj., 1982; Bobáková aj., 1985). Všechny uvedené metody jsou relativně obtížné, metodicky náročné, a tím těžko dostupné běžným diagnostickým laboratorům. Proto jsme se pokusili o průkaz BLV přímo na principu enzymové imunoanalýzy. Imunoperoxidázovým testem detekovali BLV na infikovaných buňkách BHK-21 Konopková aj. (1985). Naším konečným cílem byl průkaz BLV na lymfocytech stejným způsobem.

Abychom zvládli metodiku provedení tohoto testu, pokusili jsme se o průkaz BLV nejdříve na buňkách FLS, klon G I/II, který je infikován BLV a trvale jej produkuje. Přítomnost viru v této buněčné linii byla potvrzena elektronoskopicky (Valíček aj., 1985). Tato buněčná linie FLS buněk se rovněž používá k přípravě antigenu (Franz aj., 1984) pro ELISA soupravu k diagnostice EBL, vyráběnou n. p. Bioveta, Ivanovice na Hané. Naše experimenty prokázaly v obou pokusech vysokou shodu mezi pozitivními reakcemi imunoenzymatického testu na FLS buňkách a průkazem anti-BLV protilátek. Tento výsledek potvrzuje specifčnost prokazovaných anti-BLV protilátek. Výsledky přímo nabízejí myšlenku, že metody by bylo možné využít ke kontrole buněčných linií používaných k produkci BLV antigenu pro diagnostické účely. Bylo totiž prokázáno, že klonováním původní buněčné linie FLS buněk lze získat linie s různou produkcí viru (Bán aj., 1985). Metoda by mohla být — vedle jiných (po zvládnutí kvantitativního způsobu vyjadřování výsledků) využita k vyhledávání, resp. ke kontrole buněčných linií s optimální produkcí BLV.

Zkušenosti, které jsme získali při práci s FLS buněčnou linií, byly využity při provádění imunoperoxidázového testu na lymfocytech v krátkodobých kulturách leukocytů. Test byl ověřen na lymfocytech tří modelových zvířat, u nichž byla přesně definována doba infekce BLV. Prokázali jsme pozitivní výsledek imunoenzymatického testu na lymfocytech u zvířete krátce po infekci (20. a 41. den), ale také u zvířete za rok po experimentální infekci. Rovněž kráva evidovaná pět roků jako sérologicky i hematologicky reagent (perzistující lymfocytóza) byla pozitivní. Ve všech těchto případech byl pozitivní také výsledek elektronoskopického vyšetření rastrovacím mikroskopem. U kontrolních zvířat byl test vždy negativní. Na základě těchto výsledků můžeme imunoenzymatický test na lymfocytech doporučit jako relativně jednoduchou

metodu k průkazu BLV u infikovaných zvířat, ovšem vzhledem k poměrně malému počtu lymfocytů nesoucích genom BLV je tato metoda v počátečních stadiích onemocnění málo citlivá.

Z naší práce, která měla především metodický charakter, vyplynuly i některé poznatky, které mají význam bezprostředně pro praxi. Bylo prokázáno, že zvířata po infekci jsou dlouhodobě nosiči viru, neboť jsme prokazovali lymfocyty s integrovaným BLV od 20. dne infekce až do doby pěti roků po infekci. Tento poznatek je třeba brát v úvahu při realizaci programu tlumení enzootické leukózy skotu. Všichni sérologičtí reagenti představují obecně bezprostřední nebezpečí pro ozdravované stádo.

## Literatura

- ALTANER, Č. — ČERNÝ, L.: Stanovení reverzní transkriptázy v krevní plazmě leukemických dojníc. In: ČERNÝ, L.: Pokus o průkaz virové etiologie lymfatické leukemie skotu. [Výzkumná zpráva.] Brno, Vysoká škola veterinární 1977, 103 s.
- ALTANER, Č. — ZAJAC, V. — ČERNÝ, L.: Nové přístupy k rychlé a hromadné diagnostice bovinní leukózy. Veterinářství, XXXII, 1982, s. 389-391.
- BÁN, J. — ZAJAC, V. — ALTANER, Č. — KETTMANN, R. — BURNÝ, A.: Isolation and characterization of cell clones producing various amounts of bovine leukosis virus (poster). VIII Meeting of the European Association for Cancer Research, Bratislava 1985.
- BOBÁKOVÁ, M. — LEŠNÍK, F. — VRTIAK, O. J.: Testovanie vnímavosti bunkových kultúr k infekcii vírusom bovinnej leukózy. Veter. Med. (Praha), 30, 1985, s. 267-274.
- FRANZ, J. — HAMPL, J. — HOFÍREK, B. — SVOBODA, I. — GRANÁTOVÁ, M.: Radioimunologický průkaz protilátek proti viru leukózy skotu. Veter. Med. (Praha), 31, 1986, v tisku.
- FRANZ, J. — SVOBODA, I. — HAMPL, J. — GRANÁTOVÁ, M. — MÁDR, V. — KOZÁKOVÁ, A. — MACHATKOVÁ, M. — HOFÍREK, B. — JAGOŠ, P. — DEDEK, L. — MACURA, B.: Diagnostika leukózy skotu. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1984, 38 s.
- HOFÍREK, B. — VAREJKA, F.: Použití imunodifúze (ID) v sérologické diagnostice enzootické leukózy skotu. Veterinářství, XXVIII, 1978, s. 154-156.
- HOFÍREK, B. — HORÍN, P. — GRANÁTOVÁ, M. — MACHATKOVÁ, M. — FRANZ, J. — SVOBODA, I. — BLECHA, J.: Experimentální a přirozená infekce virem enzootické leukózy skotu (BLV). Veter. Med. (Praha), 31, 1986, s. 129-140.
- KONOPKOVÁ, M. — LEŠNÍK, F. — KUMIČÁKOVÁ, E. — ALEXANDER, R.: Důkaz bovinního leukotického viru v bunkových kulturách. Čs. Fysiol., 34, 1985, s. 51.
- LEŠNÍK, F. — VRTIAK, J. O.: Štúdium leukózy hovädzieho dobytku. [Výzkumná správa.] Košice, Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny 1984, 120 s.
- LIEBERMANN, H. — SCHERFF, I. — WITTMANN, W. — RIEBE, R.: Direkter Virusnachweis bei enzootischer Rinderleukose mit Hilfe von Zellkulturen. Arch. exp. Veter.-Med., 36, 1982, s. 943-949.
- MACURA, B. — DEDEK, L. — FRANZ, J. — HOFÍREK, B. — SVOBODA, I.: Příspěvek k diagnostice bovinní virové leukózy ELISA testem z n. p. Bioveta Ivanovice na Haně. In: Zbor. Ref. I. veter. onkolog. Dni, Košice, ÚEVM 1984, s. 62-65.
- RÖSSLER, H. — WERNER, O. — DRESCHER, B. — WITTMANN, W. — VENKER, P. — ROSENTHAL, S.: Ein verbesserter Test zum Nachweis der reversen Transkriptase des Rinderleukosevirus. Arch. exp. Veter.-Med., 34, 1980, s. 595-615.
- VALÍČEK, L. — ŠMÍD, B. — MACHATKOVÁ, M.: Elektronová mikroskopie viru leukózy skotu BLV v buněčné linii fetální jehněčí sleziny. Veter. Med. (Praha), 30, 1985, s. 37-44.
- ZÁVADA, J. — ČERNÝ, L. — ZÁVADOVÁ, Z. — BOŽOŇOVÁ, J. — ALTSTEIN, A. D.: A rapid neutralization test for antibodies to bovine leukemia virus, with the use of rhabdovirus pseudotypes. J. Nat. Cancer Inst., 62, 1979, s. 95-101.

Došlo dne 9. 12. 1985

ГОФИРЕК, Б. — ГРАНАТОВА, М. — ГОРЖИН, П. — МАДР, В. — ПЛЕВА, В. (Ветеринарный институт, Брно; Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): **Иммуноэнзиматическое доказательство вируса энзоотического лейкоза скота (BLV) в клеточных культурах.** Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 385-392.

В работе описывается методика проведения иммуноэнзиматического теста для доказательства вируса энзоотического лейкоза скота (BLV) на клетках летальных селезеночек ягнят (FLS), постоянно вырабатывающих BLV, и на лимфоцитах инфицированных животных. В обоих случаях, как в клетках FLS, так и в лимфоцитах, был BLV доказан иммунопероксидазным тестом. При помощи дефинированных сывороток, полученных от животных, зараженных экспериментальной и естественной инфекцией, был BLV указанным тестом доказан в клетках FLS во всех случаях, когда были применены положительные сыворотки с анти-BLV антителами. Аналогически был доказан BLV в лимфоцитах инфицированных животных, у которых время инфекции было точно определено. Метод иммунопероксидазного теста на лимфоцитах рекомендуется в определенных случаях для доказательства BLV у инфицированных животных.

вирус лейкоза крупного рогатого скота; лимфоциты; иммунопероксидазный тест

HOFÍREK, B. — GRANÁTOVÁ, M. — HOŘÍN, P. — MÁDR, V. — PLEVA, V. (University of Veterinary Medicine, Brno; Veterinary Research Institute, Brno): **Immunoenzymic Detection of Enzootic Bovine Leukosis Virus (BLV) in Cell Cultures.** Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 385-392.

There is a description of the method of immunoenzymic test used for detection of enzootic bovine leukosis virus (BLV) on the cells of foetal lamb spleen (FLS) permanently producing BLV and on the lymphocytes of infected animals. In both cases (in FLS cells and lymphocytes) the presence of BLV was demonstrated by the immunoperoxidase test. Using the defined serums from the animals after experimental and natural infection, BLV was detected by the above-mentioned test in FLS cells in all cases of the use of positive serums with anti-BLV antibodies. The specificity of the antibodies was also demonstrated in this way. The presence of BLV was analogically detected in the lymphocytes of the infected animals where the infection time was precisely defined. The method of immunoperoxidase test on lymphocytes is recommended in indicated cases for the demonstration of the presence of BLV in infected animals.

bovine leukosis virus; lymphocytes; immunoperoxidase test

HOFÍREK, B. — GRANÁTOVÁ, M. — HOŘÍN, P. — MÁDR, V. — PLEVA, V. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno; Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): **Immunoenzymatischer Nachweis des Virus der enzootischen Rinderleukose (BLV) in Zellkulturen.** Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 385-392.

In der Arbeit wird eine Methodik zur Durchführung eines immunoenzymatischen Testes zum Nachweis des Virus der enzootischen Rinderleukose (BLV) u. zw. an stetig BLV produzierenden Zellen letaler Lämmermilz (FLS) und an Lymphozyten infizierter Tiere, beschrieben. In beiden Fällen, sowohl in den FLS-Zellen als auch in den Lymphozyten, wurde das BLV mittels Immuno-Peroxidase-Test nachgewiesen. Mit Hilfe definierter, von Tieren nach experimenteller sowie natürlicher Infektion gewonnener Seren wurde das BLV durch den angeführten Test in den FLS-Zellen u. zw. in allen Fällen, wo positive Seren mit Anti-BLV-Antikörpern eingesetzt wurden, nachgewiesen. Dadurch wurde auch die Spezifität der nachzuweisenden Antikörper nachgewiesen. Analog wurde auch das BLV in Lymphozyten infizierter Tiere, bei denen der Infektionszeitraum genau definiert war, nachgewiesen. Die Methode des Immuno-Peroxidase-Testes an Leukozyten ist in indizierten Fällen zum Nachweis des BLV bei infizierten Tieren zu empfehlen.

Virus der bovinen Leukose (BLV); Lymphozyten; Immuno-Peroxidase-Test

---

#### Adresy autorů:

Doc. MVDr. Bohumír Hofírek, CSc., MVDr. et RNDr. Petr Hořín, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

RNDr. Marta Granátová, MVDr. Vojtěch Mádr, CSc., MVDr. Vladimír Pleva, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

---

# INTRAMAMMÁLNE TELIESKO V BOJI PROTI INFEKČNÝM MASTITÍDAM KRÁV

V. Baran, P. Petřík, F. Federič, R. Škarda, L. Lenhardt

---

BARAN, V. — PETŘÍK, P. — FEDERIČ, F. — ŠKARDA, R. — LENHARDT, L. (Vysoká škola veterinárská, Košice; Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice): *Intramamálne teliesko v boji proti infekčným mastitídam kráv*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 393-402.

Štyridsiatim dojniciam sme do mliečnej misterny dvoch mammálnych štvrtí vložili sterilné polyetylénové teliesko. Kravy boli rozdelené do troch skupín podľa dĺžky expozície telieska v cisterne (3 dni, 14 dní, 365 dní). Ročným sledovaním počtov somatických buniek v prvej 10ml frakcii mlieka bolo zistené ich zvýšenie u štvrtí s telieskom viac než o jednu tretinu proti kontrolným štvrtiam (bez telieska). Tento rozdiel bol výrazný v laktácii a pred zasúšením. Pri znižovaní frekvencie výskytu nových prirodzených intramamálnych infekcií bola účinnosť telieska voči *S. aureus* obmedzená a voči *S. agalactiae* nebola dokázaná. Histologicky sme sledovali zastúpenie polymorfonukleárov, okružlobunečných elementov a makrofágov v porovnaní medzi štvrtami s telieskom a bez neho v korelácii s dĺžkou expozície telieska v mliečnej cisterne. Najvýraznejšie rozdiely v prospech štvrtí s telieskom boli v alveolách, ktoré obsahovali vyšší počet buniek s výrazným zastúpením polymorfonukleárných leukocytov. Malé rozdiely boli zistené v interstíciu a subepiteliálnej zóne mliečnej cisterny. Histochemicky bola stanovená aktivita kyslej a alkalickéj fosfatázy a adenozíntrifosfatázy v jednotlivých tkanivových štruktúrach vemena a bolo zistené, že táto aktivita sa pôsobením telieska nemení. Elektronovým rastrovacím mikroskopom sme pozorovali leukocyty a makrofágy adherované na povrchu telieska.

bovinná mastitída; nešpecifická obrana vemena; počet somatických buniek; účinnosť telieska voči infekciám

---

Z doterajších výsledkov výskumu imunologických funkcií mliečnej žľazy vyplýva, že tento orgán je imunologicky málo aktívny. Výsledky a skúsenosti so zvyšovaním špecifickej obranyschopnosti vemena vakcináciou sú zatiaľ málo uspokojivé a z hľadiska komplexného boja proti infekčným mastitídam bezvýznamné. Vzhľadom na pestrú etiológiu mastitíd ako aj na nízku priepustnosť epitelu mliečnej žľazy pre cirkulujúce protilátky je momentálne nereálne predpokladať, že sa dosiahne úplná a pevná imunita voči mastitídam. V tomto ohľade sa zdá byť perspektívnejšou lokálna imunizácia, najmä v období státia nasucho, ktorá produkciou IgA a IgM protilátky, zaisťuje ochranu žľazy, hoci len voči obmedzenej plejáde bakteriálnych pôvodcov. Nádejnejšie výsledky vyplývajú z prvých pokusov o zvýšenie bunkovej pohotovosti mliečnej žľazy a o ovplyvnenie nešpecifickej obranyschopnosti tohoto orgánu. Anderson [1978] poznamenal, že ochrana mliečnej žľazy nemôže byť účinná bez prvej stimulácie zvýšením koncentrácie leukocytov

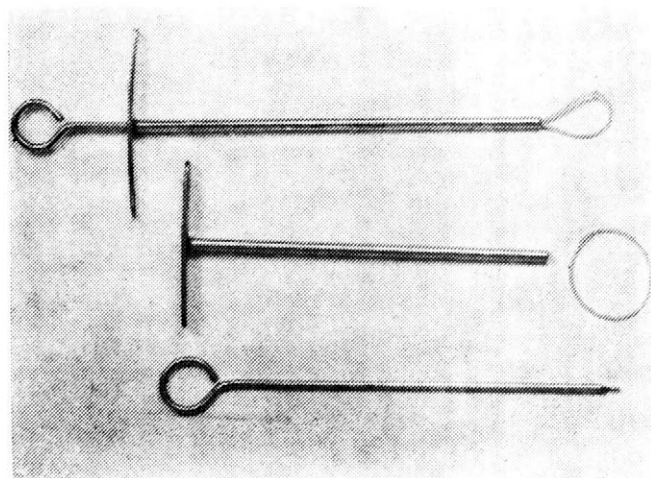
v mlieku. Paape a i. (1977) predpovedajú, že od doby, kedy mikroorganizmy invadujú mliečnu žľazu, do obdobia leukocytárnej migrácie uplynie približne 24 hodín. Preto sa pozornosť obrátila na skrátenie tohto časového intervalu v snahe zlepšiť nešpecifickú odozvu žľazy. V humánnej medicíne je používanie intrauterinných teliesok už známe. Pritom bola pozorovaná strata fertilizačnej schopnosti spermií následkom zvýšenia fagocytárnej aktivity polymorfonukleárov v prostredí maternice. Okrem týchto buniek tu boli nájdené početné makrofágy a fibroblasty (Nyklíček a Trávníček, 1973; Nyklíček a Trebičavský, 1978). U zvierat sme použili podobné polyetylénové teliesko, ktoré sme vkladali do mliečnej cisterny dojníc. Predpokladaná leukocytárna bariéra by mala zlepšiť pomery nešpecifických obranných reakcií a hlavne pripravenosť mliečnej žľazy na bakteriálnu inváziu.

## MATERIÁL A METÓDY

V pokuse bolo použitých 40 dojníc vo veku päť až osem rokov v podmienkach plnej prevádzky pri odchove dojníc. Tieto dojnice boli zaradené do pokusu na základe vyhovujúceho zdravotného stavu mliečnej žľazy. Vyšetrenie kráv s dôrazom na mliečnu žľazu zahrňovalo klinické, cytologické a bakteriologické vyšetrenie vzoriek mlieka z jednotlivých štvrtí vemena. Intramamálne teliesko (IMT) bolo vyrobené z polyetylénového vlákna o priemere 1 mm a tvorilo uzavretý kruh s vonkajším obvodom 66 mm. Pomocou intramamálneho katétra (vyrobeného z nehrdzavejúcej ocele) boli IMT asepticky zavedené do mliečnej cisterny cez ceckové ústie do dvoch štvrtí každého vemena (obr. 1, 2). Mammálne štvrte, do ktorých sme nezaviedli IMT, tvorili kontrolu. Pri vkladaní telieska sme použili metódu, ktorú uviedli Paape a i. (1981). Kravy boli rozdelené do troch skupín takto:

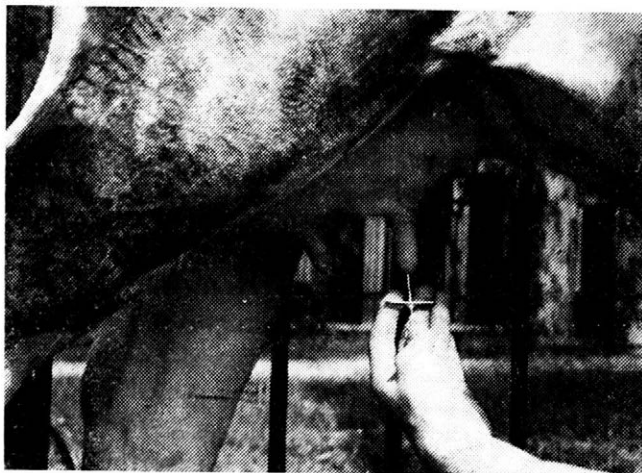
| skupina | počet kráv v skupine | expozícia IMT v mliečnej cisterne |
|---------|----------------------|-----------------------------------|
| 1       | 10                   | 3 dni                             |
| 2       | 10                   | 14 dni                            |
| 3       | 20                   | 12 mesiacov                       |

Po zavedení telieska boli dojniciam tretej skupiny pravidelne odoberané (jednakrát mesačne) vzorky mlieka z jednotlivých štvrtí na bakteriologické vyšetrenie (celkom 1176 vzoriek) a vzorky prvej 10ml frakcie mlieka na cytologické vyšetrenie



1. Intramamálny aplikátor (dĺžka katétra 97 mm, priemer katétra 2 mm) a intramamálne polyetylénové teliesko. Pred vložením do mammálnej štvrti teliesko vtiahnuté do katétra háčikom mandrénu — The intramammary applicator (catheter length 97 mm, diameter 2 mm) and intramammary PE device. Before introduction in the mammary quarter the device is drawn into the catheter by means of main drain hook

2. Vkládanie intra-  
mammálneho telieska  
do mliečnej cisterny —  
Introduction of the  
intramammary device  
into the milk cistern



(celkom 1007 vzoriek, mimo sekrétu z obdobia státia nasucho). U dojníc ostatných skupín boli odoberané vzorky mlieka na bakteriologické vyšetrenie tesne pred odporazením. Okamžite po odporazení sme z jednotlivých štvrtí vemena odoberali aj vzorky tkanív na histologické (všetky skupiny) a histochemické vyšetrenie (prvá a druhá skupina). U dojníc druhej skupiny sme excidovali použité IMT a vyšetrili sme ich pod elektrónovým rastrovacím mikroskopom. Z každej štvrte vemena sme tkanivové vzorky excidovali zo žľazového parenchýmu a mliečnej cisterny z oblasti prirodzenej lokalizácie IMT.

## SPRACOVANIE VZORIEK

Na počítanie bunkových elementov v mlieku sme použili elektronický počítač bunkových elementov COULTER COUNTER ZF 6 (COULTER ELECTRONICS LTD., Harpenden, England). Cytologické nálezy boli zhodnotené ako aritmetický priemer jednotlivých nálezov. Histologické vzorky tkanív sme farbili hematoxylin-eozínom. Pre histochemické stanovenie aktivity enzýmov sme si vytýpovali kyslú fosfatázu (KF), alkalickú fosfatázu (AF) a adenosíntrifosfatázu (ATP-áza). Vzorky sme farbili metódou podľa Lojdu a i. (1979). Odstupňovanou radou expozícií sme určili optimálny čas pôsobenia substrátu. Použité IMT sme fixovali v 3% glutaraldehyde s obsahom 0,1 M kakovylátového pufru dve hodiny pri teplote 4°C. Odvodnenie sme previedli v alkoholovej rade a sušenie v exsíkátore. Po pokovovaní zlatom vo vrstve 100 Å sme ich povrch prehliadli pod elektrónovým rastrovacím mikroskopom JEOL JSM-U3 (Japan) pri 25 kV.

## VÝSLEDKY

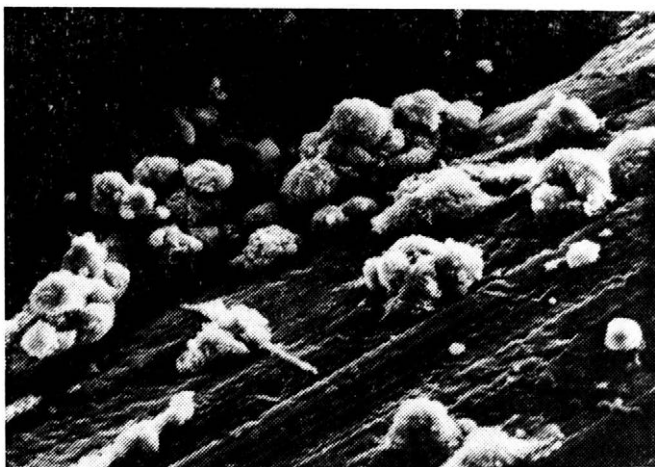
### CYTOLÓGIA A BAKTERIOLÓGIA MLIEKA

Celkový priemerný počet somatických buniek v prvej 10ml frakcii mlieka bol u štvrtí s IMT viac než o jednu tretinu vyšší než u kontrolných štvrtí (3 126 130 buniek na 1 ml u štvrtí s IMT oproti 1 951 918 buniek u štvrtí kontrolných). Najvyšší rozdiel sme zistili u dojníc pred zasušením (7 881 913—3 934 250) a v období plnej laktácie (2 611 359—1 564 392). Nepatrný rozdiel sme zaznamenali u dojníc po otelení (4 397 368—4 249 703). Pri pozitívnom bakteriologickom náleze bol počet buniek mlieka vždy vyšší u štvrtí s IMT oproti kontrolným štvrtiam.

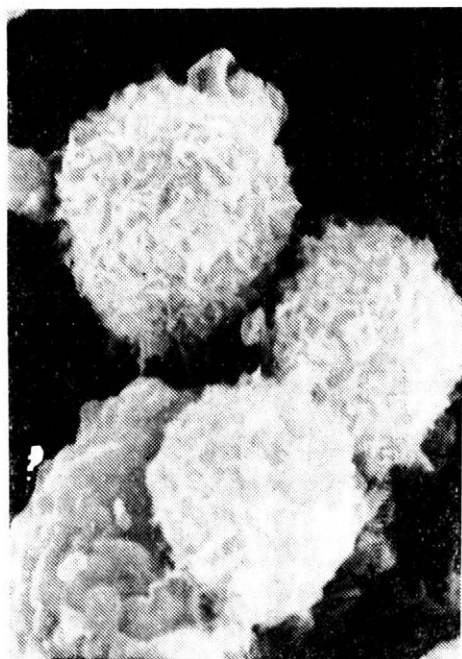
Zo 40 štvrtí, do ktorých malo byť IMT zavedené, bolo 27 bakteriologicky negatívnych (67,5 %). *S. agalactiae* bol izolovaný z deviatich štvrtí (22,5 %) a *S. aureus* zo štyroch štvrtí (10 %). Zo 40 kontrolných štvrtí bolo 27 negatívnych (67,5 %). *S. agalactiae* bol izolovaný z desiatich štvrtí (25 %) a *S. aureus* z troch štvrtí (7,5 %). Počas jedného roka sme negatívny nález so zameraním na hlavných patogénov mliečnej žľazy častejšie zaznamenali u kontrolných štvrtí (63,4 %) ako u štvrtí s IMT (55,4 %). *S. agalactiae* bol zo štvrtí s IMT izolovaný v 39,3 % a z kontrolných štvrtí v 27,2 %. *S. aureus* bol izolovaný zo štvrtí s telieskom v 5,3 % a z kontrolných štvrtí v 9,4 %.

## HISTOLÓGIA A MAKROSKOPICKÉ VYŠETRENIE

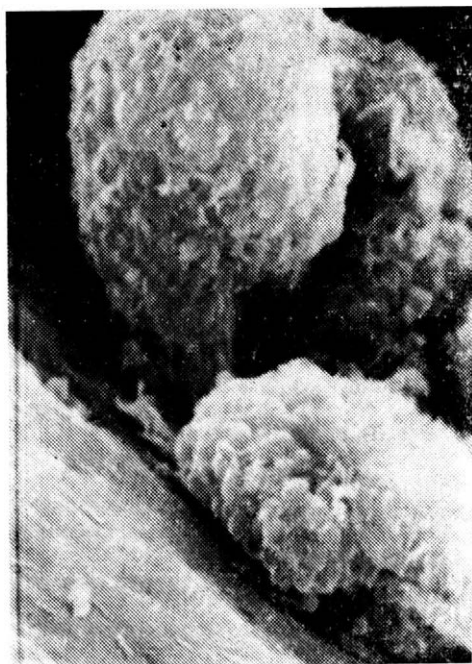
Pri makroskopickom vyšetrení mliečnej cisterny sme určili lokalizáciu IMT v dolnej časti *pars glandularis sinus lactiferi*. Teliesko tu bolo vždy voľne pohyblivé a sliznic cisterny nevykazovala poškodenie ani výskyt krvácanín, a to ani po ročnej expozícii. Pri histologickom vyšetrení sme pozornosť zamerali na polymorfonukleárne (PMN) leukocyty, lymfocyty, makrofágy a epitelové bunky mliečnej cisterny. Vyšetrenie sme robili porovnávaním nálezov z kontrolných štvrtí a zo štvrtí s IMT s použitím semikvantitatívnej metódy vyhodnocovania. Pri hodnotení nálezu makrofágov sme použili tkanivové preparáty farbené na aktivitu kyslej fosfázy (prvá a druhá skupina), ktorá je dobrým markerom pre tieto bunky (Rath, 1981). Každý preparát sme vyhodnotili v 20 až 30 zorných poliach svetelného mikroskopu. V alveolách zo štvrtí s IMT sme zistili výskyt buniek. Tento obsah buniek bolo výraznejší vo štvrtiach s kratší dobou expozície IMT. Dominantným bunčným typom tu boli polymorfonukleárne leukocyty. V zastúpení okrúhlobuniek sme nepozorovali výrazné rozdiely medzi štvrtami s IMT a kontrolami. V intersticiálnom tkanive žľazového parenchýmu sme u štvrtí s IMT zistili aj zvýšený obsah PMN leukocytov. Tento rozdiel však bol v tejto časti tkaniva oveľa menší ako v alveolách žľazy. V subepiteliálnej zóne mliečnej cisterny sme nepozorovali výrazné odlišnosti v početnosti PMN leukocytov a lymfocytov v porov-



3. Skupina buniek na povrchu intramamárneho telieska (SEM, pôvodné zväčšenie 250X) — A group of cells on the surface of the intramammary device (SEM, original magnification 250 times)



4. Makrofágy pozorované na povrchu intramamárneho telieska (SEM, pôvodné zväčšenie 2500X) — Macrophages observed on the surface of the intramammary device (SEM, original magnification 2500 times)



5. Leukocyty v tesnom kontakte s povrchom intramamárneho telieska (SEM, pôvodné zväčšenie 1200X) — Leucocytes in a close contact with the surface of the intramammary device (SEM, original magnification 1200 times)

naní so štvrtami s IMT a s kontrolnými štvrtami. Pri vyšetrovaní zastúpenia makrofágov v jednotlivých oblastiach mliečnej žľazy sme zistili len malé rozdiely v prospech žľazového parenchýmu štvrtí s IMT. Makrofágy tu boli lokalizované predovšetkým intraalveolárne, ale rozdiely v oblasti mliečnej cisterny, kde bolo zastúpenie týchto bunčných typov podstatne skromnejšie, sme nezistili. Pri porovnávaní prvej a druhej skupiny zvierat môžeme konštatovať, že sme tu nepozorovali výrazné rozdiely v zastúpení makrofágov. Celistvosť epiteliálnej výstelky mliečnej cisterny nebola ani v jednom prípade poškodená. Epitelové bunky boli pravidelne usporiadané do dvojvrstevného epitelu. Ani v jednom prípade neboli epitelové bunky deskvamované či inak alterované (obr. 4, 5).

#### HISTOCHEMICKÉ VYŠETRENIE

Aktivita alkalickéj fosfatázy u bakteriologicky negatívnych štvrtí bola najsilnejšia v endotelových bunkách niektorých krvných ciev. Stredne silnú aktivitu AF sme zistili v myoepitelových bunkách a slabú v epitelových bunkách. Pri porovnaní prvej a druhej skupiny kráv sme nepozorovali zmenu aktivity tohoto enzýmu. U dojnic s pozitívnym bak-

teriologickým nálezom v mliečnej žľaze sme pozorovali zvýšenú aktivitu AF v epitelových a myoepitelových bunkách. Tak tomu bolo v žľazovom parenchýme, ale aj v oblasti mliečnej cisterny. Pri porovnaní štvrtí s IMT s kontrolami sme nepozorovali rozdiely v aktivite AF. Pri vyhodnocovaní aktivity kyslej fosfatázy sme u bakteriologicky negatívnych štvrtí tiež nezistili rozdiely medzi štvrtami s IMT a kontrolnými štvrtami a medzi prvou a druhou skupinou dojnic. Epitelové bunky mliečnych alveol vykazovali stredne silnú aktivitu KF. Epitelové bunky mliečnej cisterny mali túto aktivitu silnejšiu. Silnou aktivitou sa prejavovali aj myoepitelové bunky. KF sme nedokázali v endotelových bunkách krvných ciev. V zápalom zmenených štvrtiach sme zistili zvýšenie aktivity KF len v epitelových bunkách alveol a cisterny. V zdravých štvrtiach s IMT a v kontrolných štvrtiach sme zistili veľmi silnú aktivitu ATP-ázy v endotelových bunkách krvných ciev. V epitelových a myoepitelových bunkách bola aktivita ATP-ázy stredne silná. U bakteriologicky pozitívnych prípadov sa aktivita tohoto enzýmu zvýšila len v epitelových bunkách. Ani tu sme nezistili rozdiely v aktivite ATP-ázy u kráv oboch skupín.

#### ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIA

Pri malom zväčšení teliesok (aj lupou) sme zistili, že pri výrobe vznikajú na ich vonkajšom obvode nepravidelné „vlajkovité“ výbežky. Pri väčšom zväčšení (okolo 1000X) sme pozorovali, že povrch IMT je relatívne hladký. Pri prehliadke sme nepozorovali erózie povrchu alebo zdrsnelé plochy, ktoré by mohli vzniknúť pri jeho zavedení. Na povrchu IMT v oblastiach výbežkov (pri ich odstupe) sme zaznamenali výskyt bunčných elementov prevažne okrúhleho tvaru. Tieto bunky sme identifikovali ako leukocyty a niektoré ako makrofágy. Bunky boli v tesnom kontakte s povrchom telieska. Vyskytovali sa v skupinách niekoľkých buniek, konglomeráty nevytvárali (obr. 3—5).

#### DISKUSIA

Výsledky našich pokusov dokazujú, že vzrast počtu somatických buniek v mlieku zo štvrtí s IMT je evidentný. Rovnaké poznatky získali aj Paape a i. (1981). Tento autorský kolektív uviedol, že najvyššiu koncentráciu buniek majú posledné frakcie mlieka, čo by mohlo byť dôležitým faktorom pri ochrane mliečnej žľazy proti patogénnym mikroorganizmom. Pri hodnotení účinku IMT v našich podmienkach pokusu na znižovanie frekvencie výskytu nových intramamálnych infekcií sme konštatovali, že polyetylénové IMT je samo neúčinné voči *S. agalactiae* a jeho účinnosť voči *S. aureus* je veľmi obmedzená. Podstatne lepšie výsledky v tomto smere dosiahli Brooks a Barnum (1982) a Huston a Heald (1983). Rozdielne výsledky však možno pripísať rozdielom v expozícii zárodkov (počet zárodkov, dĺžka ich expozície), a to v experimentálnych a zvlášť v prevádzkových podmienkach. Paape a Corlett (1984) v tejto súvislosti uviedli, že počet 900 tisíc buniek v 1 ml mlieka je limitujúci pri uplatnení sa novej intramamálnej infekcie. Ďalším dôležitým faktorom môže byť znížená

schopnosť fagocytózy mliečnych PMN leukocytov a makrofágov (Guidry a i., 1980).

Pri hodnotení účinku IMT na znižovanie frekvencie výskytu nových intramamálnych infekcií sa domnievame, že tento spôsob ochrany vemená je možný len krátku dobu po zavedení IMT, kedy podstatne vzrastá počet bunkových elementov v mlieku. Nemenej dôležitou otázkou je aj percentuálne zastúpenie jednotlivých typov buniek v mlieku, a to v rôznych fázach pohlavného cyklu. Naše histologické pozorovania sú v tomto zmysle ojedinelé, a preto s inou literatúrou doposiaľ neporovnateľné.

Histologicky sme dokázali tvrdenie o zvýšenom počte bunečných elementov v mlieku získanom zo štvrtí s IMT. Histologické obrazy tkanív vemená ukázali, že dominujúcim bunečným typom tu boli polymorfonukleáry. Tento názor je v zhode s pozorovaniami Paapeho a i. (1981), ktorí vyhodnotili diferenciálne zastúpenie jednotlivých typov buniek v mlieku získanom zo štvrtí s IMT a zo štvrtí kontrolných. Na základe našich pozorovaní sa domnievame, že tu nejde o zápalový prejav, hoci nález zvýšeného počtu buniek je evidentný. Pri histologickom vyšetrení sme nepozorovali ani v jedinom prípade edematizáciu tkanív, deskvamáciu epitelu a bakteriologicky sme u týchto štvrtí nedokázali patogénneho pôvodcu. V prospech nezápalovej reakcie svedčí aj náš nález nezmenenej aktivity nami sledovaných enzýmov. Pri komplexnom pohľade na tento problém sa zdá, že ide o nevýraznú odozvu mliečnej žľazy pri aktivácii svojich obranných reakcií na zavedenie sterilného polyetylénového telieska. Schultz (1977) uviedol, že jedine infekčné patogény pre mliečnu žľazu sú schopné vyvolať dostatočnú a maximálnu bunkovú odpoveď, hoci nepopiera, že prítomnosť nepatogénnych zárodkov v tomto orgáne môže poskytnúť určitú ochranu vďaka zvýšeniu počtu bunečných elementov.

Norcross (1977) vo svojej štúdii tvrdí, že pravdepodobným obranným mechanizmom sa tu zdá byť aktivita mononukleárných fagocytov v nelaktujúcej a polymorfonukleárov v laktujúcej mliečnej žľaze. Bunečná obrana tu môže existovať vďaka špecificky stimulovaným lymfocytom, ktoré na druhej strane svojimi lymfokinínmi ovplyvňujú fagocytózu a baktericídne vlastnosti makrofágov. Je samozrejmé, že tieto imunitné mechanizmy nastupujú až po ich antigénnej stimulácii. Vo vzťahu k našim pokusom možno predpokladať, že pri použití sterilného IMT budú spúšťacie faktory špecifickej imunologickej odozvy mliečnej žľazy nedostatočné, a to vzhľadom na nedostatočnú kooperáciu buniek spracovávajúcich antigén s bunkami tvoriacimi protilátky. O dôležitosti tohoto imunologického článku svedčí aj nález lymfoidných buniek s ich najväčším zastúpením v oblasti subepiteliálnej zóny ceckovej cisterny zdravej laktujúcej mliečnej žľazy dojnic, ako to uviedli Nickerson a i. (1984). Dobrú toleranciu tkanív mliečnej žľazy dokumentujú makroskopické pozorovania v oblasti mliečnej cisterny. Takto sa vytvorili dobré predpoklady pre vývoj nových liekových foriem (antibiotiká) aplikovaných intramamálne v tejto forme. Použitie IMT však môže priniesť nový pohľad a nové možnosti do budúcnosti, a prispieť tak k vypracovaniu nových metód prevencie mastitíd.

## Literatúra

- ANDERSON, J. C.: The problem of immunization against staphylococcal mastitis. Brit. veter. J., 134, 1978, s. 412-420.
- BROOKS, B. W. — BARNUM, D. A.: The use of polyethylene intramammary device in protection of the lactating bovine udder against experimental infection with *Staphylococcus aureus* or *Streptococcus agalactiae*. Can. J. comp. Med., 46, 1982, s. 267-269.
- GUIDRY, A. J. — PAAPE, M. J. — PEARSON, R. E.: Effect of udder inflammation on milk immunoglobulins and phagocytosis. Amer. J. veter. Res., 41, 1980, s. 751-753.
- HUSTON, G. E. — HEALD, C. W.: Effect of the intramammary device on milk infection status, yield and somatic cell count and the morphological features of the lactiferous sinus of bovine udder. Amer. J. veter. Res., 44, 1983, s. 1856-1860.
- LOJDA, Z. — GOSSRAU, R. — SCHIEBLER, T. N.: Enzyme histochemistry. A laboratory manual. Berlin — Heidelberg — New York, Springer Verlag 1979, 339 s.
- NICKERSON, S. C. — PANKEY, J. W. — BOODIE, N. T.: Distribution, location and ultrastructure of plasma cells in the uninfected lactating bovine mammary gland. J. Dairy Res., 51, 1984, s. 209-217.
- NORCROSS, W. K.: Immune response of the mammary gland and role of immunization in mastitis control. J. Amer. veter. med. Assoc., 170, 1977, s. 1228-1231.
- NYKLÍČEK, A. — TRÁVNÍČEK, J.: Cytologický a imunologický stav při IUD. Českoslov. Gynec., 38, 1973, s. 158-159.
- NYKLÍČEK, O. — TREBICHAVSKÝ, I.: Zánět nebo imunitní proces při IUD? Českoslov. Gynec., 43, 1978, s. 532.
- PAAPE, M. J. — CORLETT, N. J.: Intensification of milk somatic cell response to intramammary device. Amer. J. veter. Res., 45, 1984, s. 1572-1575.
- PAAPE, M. J. — PEARSON, R. E. — WERGIN, W. P. — GUIDRY, A. J.: Enhancement of chemotaxis response of polymorphonuclear leucocytes into the mammary gland and isolation from milk. J. Dairy Sci., 60, 1977, s. 53-62.
- PAAPE, M. J. — SCHULTZE, W. D. — GUIDRY, A. J. — KORTUM, W. M. — WEILAND, B. T.: Effect of an intramammary polyethylene device on the concentration of leukocytes and immunoglobulins in milk and on the leukocyte response to *Escherichia coli* endotoxin and challenge exposure with *Staphylococcus aureus*. Amer. J. veter. Res., 42, 1981, s. 774-783.
- RATH, F. W.: Praktisch-diagnostische Enzymohistochemie. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag 1981, 219 s.
- SCHULTZ, L. H.: Somatic cell counting of milk in production testing programs as a mastitis control technique. J. Amer. veter. med. Assoc., 170, 1977, s. 1244-1246.

Došlo dňa 22. 3. 1985

БАРАН, В. — ПЕТРИК, П. — ФЕДЕРИЧ, Ф. — ШКАРДА, Р. — ЛЕНАРД, Л. (Институт ветеринарии, Кошице; Институт экспериментальной ветеринарии, Кошице): **Интра-маммарное тельце в борьбе с инфекционным маститом.** Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 393-402.

Сорока дойным коровам было в молочную цистерну двух маммарных четвертей вложено стерильное полиэтиленовое тельце. Коровы были разделены на три группы в зависимости от продолжительности экспозиции тельца в цистерне (3 дня, 14 дней, 365 дней). Годовым наблюдением роста соматических клеток в первой 10 мл фракции молока было обнаружено их повышение у четвертей с тельцем более, чем на 30 % по сравнению с контрольной четвертью (без тельца). Эта разница была выразительна в лактации и перед сушкой. Для снижения частоты появления новых естественных интрамаммарных инфекций была действительность тельца против *S. aureus* ограничена и против *S. agalactiae* не была доказана. Велись гистологические наблюдения за замещением полиморфонуклеаров, круглоклеточных элементов и макрофагов по сравнению с четвертями с вложенным тельцем и без него в корреляции с продолжитель-

ностью экспозиции тельца в молочной цистерне. Самая выразительная разница в пользу четвертей с вложенным тельцем была в альвеолах, которые содержали большее количество клеток, с выразительным замещением полиморфонуклеарных лейкоцитов. Небольшая разница была обнаружена в интерстиции и в подэпителиальной зоне молочной цистерны. Гистохимическая была установлена активность кислой и щелочной фосфатазы и аденозинтрифосфатазы в отдельных структурах ткани вымени. Было обнаружено, что эта активность под влиянием тельца не меняется. С помощью электронного растрового микроскопа велись наблюдения за лейкоцитами и макрофагами, прилипшими на поверхности тельца.

мастит крупного рогатого скота; неспецифическая защита вымени; количество соматических клеток; действенность тельца против инфекций

BARAN, V. — PETRÍK, P. — FEDERIC, F. — ŠKARDA, R. — LENHARDT, L. (University of Veterinary Medicine, Košice; Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice): *An Intramammary Device to Combat Infectious Mastitis in Cows*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 393-402.

A sterile polyethylene device was introduced in the milk cistern of two mammary quarters of forty dairy cows. The cows were divided into three groups according to the length of exposure of the device in the cistern (3 days, 14 days, 365 days). The somatic cell counts were studied for a year in the first 10ml fraction of milk and an increase in the somatic cell counts was found in the quarters having the intramammary device, as compared with the control quarters (having no devices). This difference was marked during lactation and prior to the onset of drying off. For the reduction in the frequency of occurrence of new natural intramammary infections, the activity of the device against *S. aureus* was limited and no activity against *S. agalactiae* was proved. The proportions of polymorphonuclears, round-cell elements and macrophages were histologically studied and compared for the udder quarters with and without the intramammary body in correlation with the time of exposure of the device to the milk cistern milieu. The most marked differences in favour of the udder quarters with the intramammary device were recorded in the alveoli containing more cells with a significant proportion of polymorphonuclear leucocytes. Small differences were found in the interstitial and subepithelial zone of the milk cistern. The activity of acid and alkaline phosphatase and adenosine triphosphatase was histochemically determined in the tissue structures of the udder and was found not to change under the influence of the device. Leucocytes and macrophages adhering to the surface of the body were observed under scanning electron microscope.

bovine mastitis; non-specific defence of udder; somatic cell counts; action of intramammary device against mastitis

BARAN, V. — PETRÍK, P. — FEDERIC, F. — ŠKARDA, R. — LENHARDT, L. (Veterinärmedizinische Hochschule, Košice; Institut für experimentelle Veterinärmedizin, Košice): *Intramammaries Körperchen im Kampf gegen infektiöse Mastitiden bei Kühen*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 393-402.

Bei vierzig Milchkühen wurde in die Milchzisterne zweier Euterviertel ein steriles Körperchen aus Polyäthylen eingelegt. Die Kühe waren in drei Gruppen u. zw. der Länge der Exposition des Körperchens in der Zisterne nach, eingeteilt (3 Tage, 14 Tage, 365 Tage). Aufgrund einer ein Jahr dauernden Ermittlung der Zahlen somatischer Zellen in der ersten 10 ml-Fraktion der Milch wurde eine Erhöhung der Anzahl dieser Zellen um mehr als ein Drittel bei den Eutervierteln mit dem eingelegten Körperchen gegenüber den Kontrollvierteln (d. h. ohne Körperchen) verzeichnet. Dieser Unterschied war sowohl während der Laktation als auch vor dem Trockenstellen bedeutend. In bezug auf die Verminderung der Frequenz des Aufkommens neuer natürlicher intramammärer Infektionen war die Wirksamkeit des Körperchens gegenüber *S. aureus* nur begrenzt und gegenüber *S. agalactiae* nicht nachweisbar. Auf histologischem Wege untersuchten wir das Vorhandensein von Polymorphonuklearzellen, runden Zellelementen und Makrophagen im Vergleich zwischen den Vierteln mit und ohne Körperchen und dies in Korrelation mit der Länge der Exposition des Körperchens in der Milchzisterne. Die stärksten Unter-

schiede zugunsten der Euterviertel mit den Körperchen waren in Alveolen, die eine höhere Anzahl von Zellen mit ausgeprägter Vertretung polymorphonuklearer Leukozyten enthielten, zu verzeichnen. Geringe Unterschiede wurden im Interstitium und in der subepithelialen Zone der Milchzisterne festgestellt. Histochemisch wurde die Aktivität der Säure- und der Alkaliphosphatase sowie der Adenosintriphosphatase in den einzelnen Gewebestrukturen des Euters ermittelt. Es wurde festgestellt, daß sich diese Aktivitäten durch die Auswirkung des Körperchens nicht ändern. Mit Hilfe eines Raster-Elektronenmikroskops konnten an der Oberfläche des Körperchens adhärenzte Leukozyten und Makrophagen beobachtet werden.

bovine Mastitis; nichtspezifische Abwehr des Euters; Anzahl somatischer Zellen; Wirkungskraft des Intramammarkörperchens gegen Infektionen

---

**Adresy autorov:**

MVDr. Vladimír Baran, CSc., MVDr. Pavol Petrik, CSc., prof. MVDr. Rudolf Skarda, CSc., MVDr. Ľudovít Lenhardt, CSc., Vysoká škola veterinárska, Komenského 73, 040 81 Košice

MVDr. František Federič, CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Dukelských hrdinov 1, 040 01 Košice

---

# ZMĚNY KONCENTRACE BÍLKOVIN KREVŇÍHO SÉRA SELAT V PRŮBĚHU VÝVOJE A PŘI STRESU

M. Dvořák

---

DVOŘÁK, M. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Změny koncentrace bílkovin krevního séra selat v průběhu vývoje a při stresu*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 403-414.

Koncentrace celkové bílkoviny (CB), albuminu a globulinu krevního séra byla zjišťována v sedmi pokusech u 203 selat odstavených ve věku tři až čtyři týdny. U novorozených selat před napitím mleziva byly hodnoty nejnižší. Za dva dny se zvýšila hladina CB trojnásobně a globulinu téměř pětinašobně. Potom se začaly snižovat, víc u globulinu, a snižování trvalo až do konce druhého měsíce věku. Albuminémie se zvyšovala od narození až do konce sledování začátkem třetího měsíce, bez zřetelného vlivu příjmu mleziva a se sníženou intenzitou v důsledku odstavu. Albumino-globulinový kvocient, nejnižší druhý den života, se postupně zvyšoval. U selat lépe rostoucích byla většinou zjišťována vyšší albuminémie a po odstavu dřívější úprava hypoglobulinémie než u selat hůře prosperujících. Lze usuzovat, že výživa, tělesný růst a syntéza albuminu i globulinu se u selat vzájemně podmiňují. Zvýšení sérových kortikosteroidů, vyvolané dvoudenním hladováním nebo dvoji aplikací adrenokortikotropního hormonu (ACTH), způsobilo neprůkazný vzestup koncentrace albuminu. Vysoká hladina kortikosteroidů za dvě hodiny po aplikaci ACTH nebyla doprovázena změnou sérových bílkovin.

celková bílkovina; albumin; globulin; kortikosteroidy; růst

---

V koncentraci albuminu a globulinu, a tím i celkové bílkoviny (CB) krevního séra, dochází v průběhu života k různým fyziologickým a patologickým změnám, které mohou být ovlivněny i odlišnou lokalizací jejich tvorby.

Hladina sérového albuminu spolu s přírůstkem tělesné hmotnosti jsou funkcí příjmu bílkovin a aminokyselinového složení potravy (Mercer aj., 1979). Vztah jeho nízké koncentrace k proteinové deprivaci byl také zjištěn u prasat (Atinmo aj., 1976; Dvořák, 1981; Yen aj., 1982; Pond a Yen, 1984). Kvantitativní stanovení albuminu v krevním séru je považováno za důležitý parametr metabolického profilu (Ursache aj., 1979). Odsunuje rozšíření určování CB v séru do pozadí klinické diagnostiky, přestože i zjištění její hladiny může být významné (Schalm, 1970) — mimo jiné i v předpovědi onemocnění a mortality, jak bylo zjištěno u telat v průběhu pěti týdnů po narození (Naylor aj., 1977). Při hodnocení jejich imunitního stavu může CB nahradit stanovení celkových imunoglobulinů.

Koncentrace sérových bílkovin se mění v závislosti na věku. Dochází k tomu také u prasat, jak starších (Doornenbal aj., 1983),

tak zejména u selat. Velmi nízká je hladina CB u plodů, u nichž v době mezi 74. a 114. dnem březosti nemá stálý vzrůstající trend (Ježková a Padalíková, 1977). Také novorozená prekolostální selata mají málo sérových bílkovin. Krevní sérum lehčích selat se od séra jejich těžších sourozenců liší menším zastoupením albuminu a větším obsahem globulinu (Mašek a Holub, 1970). Druhý den až třetí týden života selat je zjišťováno několikanásobné zvýšení hladiny CB a globulinu a menší vzestup u albuminu (Tumbleson a Kalish, 1972; Tumbleson aj., 1972; Svendsen aj., 1972; Dvořák, 1978). V údajích o jejich změnách jsou značné rozdíly, intervaly mezi vyšetřeními jsou někdy dost dlouhé, často chybí parametry tělesného růstu a doba odstavu, většinou není ukázán vliv příjmu mleziva. Jeho význam není jasný zejména pro vzestup albuminémie. Je udáváno, že se zvyšuje po příjmu mleziva (Karlsson, 1970; Carlsson aj., 1980), ale také až po zastavení absorpce kolostrálních proteinů z gastrointestinálního traktu selat. Jaterní syntéza sérového albuminu se u selat během prvních deseti dní po narození asi desateronásobně zvyšuje (Hakkarainen, 1975).

I jiné faktory než nutriční nebo vývojové však mohou ovlivnit koncentraci bílkovin v krevním séru. Překvapivé je zjištění zvýšené hladiny CB a albuminu při hladovění skotu i prasat (Baetz aj., 1971; Blum aj., 1981). Hypoalbuminémie se nemusí při proteinové malnutrici objevit u stavů spojených se zvýšením cirkulujících kortikosteroidů (Coward aj., 1977).

V této studii jsou zjišťovány změny koncentrace CB, albuminu a globulinu, jakož i albumino-globulinového (A/G) kvocientu v průběhu vývoje selat ve vztahu k intenzitě jejich růstu vyjádřeného tělesnou hmotností se zvýšeným zaměřením na období po časném odstavu, pro které chybí postačující podklady. Vzhledem k tomu, že odstav selat od prasnice může vyvolat stresový stav (Dvořák, 1972) a výrazně zpomalený tělesný růst odstavených selat je doprovázen zvýšenou adrenokortikální aktivitou (Dvořák, 1975), jsou testovány také účinky zvýšené hladiny kortikosteroidů, vyvolané hladověním nebo exogenním ACTH.

## MATERIÁL A METODY

V sedmi pokusech bylo použito celkem 203 selat bílého ušlechtilého plemene, narozených a chovaných ve stájích Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně. Sající selata byla první den po narození ošetřena preventivně proti anémii, od druhého týdne měla k dispozici startér COS 2 a vodu. Odstavená selata byla umístěna v kotcích se slamatou podestýlkou, se stálou nabídkou sypkého startéru.

V prvním a druhém pokusu byly zjišťovány vývojové změny sérových bílkovin od narození do 21. dne po časném odstavu ve vztahu k větší nebo menší tělesné hmotnosti sourozenců. Opakovaně bylo vyšetřováno 56 selat odstavených od prasnice v průměrném věku 28 dní a 28 selat odstavených v průměrném věku 21 den.

Ve třetím pokusu byly stanoveny vývojové změny u pěti skupin po pěti až čtrnácti selatech při sedmi vyšetřeních v období 28 až 42 dní po časném odstavu ve čtvrtém týdnu věku. Byl u nich hodnocen i vztah zjištěných hodnot k přírůstku tělesné hmotnosti za 28 dní po odstavu.

Ve čtvrtém pokusu bylo použito 20 selat, z nichž polovina byla v průměrném věku 29 dní odstavena a měla k dispozici startér; také druhá část sourozenců byla odebrána od prasnice, nebylo jí však po dva dny předloženo krmivo, jen pitná voda.

Vliv zvýšené adrenokortikální funkce byl zjišťován ve dvou pokusech u sajících selat a v jednom pokuse u selat odstavených. V pátém pokusu bylo použito

18 selat v průměru 15 dní starých. Pokusným selatům o hmotnosti  $4,15 \pm 0,19$  kg byla v 8.00 hodin odebrána krev a potom jim byl aplikován *i. m.* adrenokortikotropní hormon (ACTH) v jednotné dávce 0,25 mg Cortrosynu (Organon). Za dvě hodiny byla jim i kontrolním sourozencům o hmotnosti  $4,11 \pm 0,18$  kg opět odebrána krev k vyšetření. V šestém pokusu bylo použito 18 selat v průměru 11 dní starých. Pokusným selatům o hmotnosti  $4,17 \pm 0,26$  kg bylo po odběru krve první den v 8.00 hodin injikováno *i. m.* 0,12 mg Cortrosynu a v 15.00 hodin dalších 0,25 mg. Druhý den v 8.00 hodin jim byla spolu s devíti kontrolními sourozenci vážícími  $4,12 \pm 0,94$  kg opět odebrána krev. V sedmém pokusu byl vliv stimulace kůry nadledvin zjišťován u deseti selat o hmotnosti  $17,37 \pm 1,04$  kg za 34 dny po časném odstavu. Těmto selatům bylo ráno aplikováno 0,25 mg a za sedm hodin potom 0,50 mg Cortrosynu. Druhý den ráno jim byla spolu s devíti kontrolními sourozenci vážícími  $17,19 \pm 1,12$  kg opět odebrána krev k vyšetření.

U všech pokusů jsme veškerá experimentální ošetření, odběry krve z přední duté žíly a vážení selat prováděli, pokud ve výsledcích není uvedeno jinak, v 8.00 až 9.00 hodin ráno, bez předchozího omezení příjmu potravy. Relativní přírůstek tělesné hmotnosti byl počítán podle vzorce

$$q = \frac{y_2 - y_1}{y_1} \cdot 100$$

kde:  $y_1$  — počáteční hmotnost  
 $y_2$  — hmotnost v určitém věku

V krevním séru byla stanovena hladina kortikosteroidů (11-hydroxykortikosteroidů) fluorometrickou metodou popsanou dříve (Raszyk a Dvořák, 1976), koncentrace celkové bílkoviny (CB) při použití Bio-La-testu (Lachema Brno), koncentrace albuminu podle Rodkeye (1965) a Dvořáka (1981). Koncentrace globulinu byla vypočtena odečtením hodnoty albuminu od CB a albumino-globulinový kvocient je podíl albuminu ku globulinu (A/G). Výsledky jsou uváděny v aritmetických průměrech se střední chybou průměru. Statistická průkaznost rozdílů průměrů byla vypočtena použitím Studentova *t*-testu.

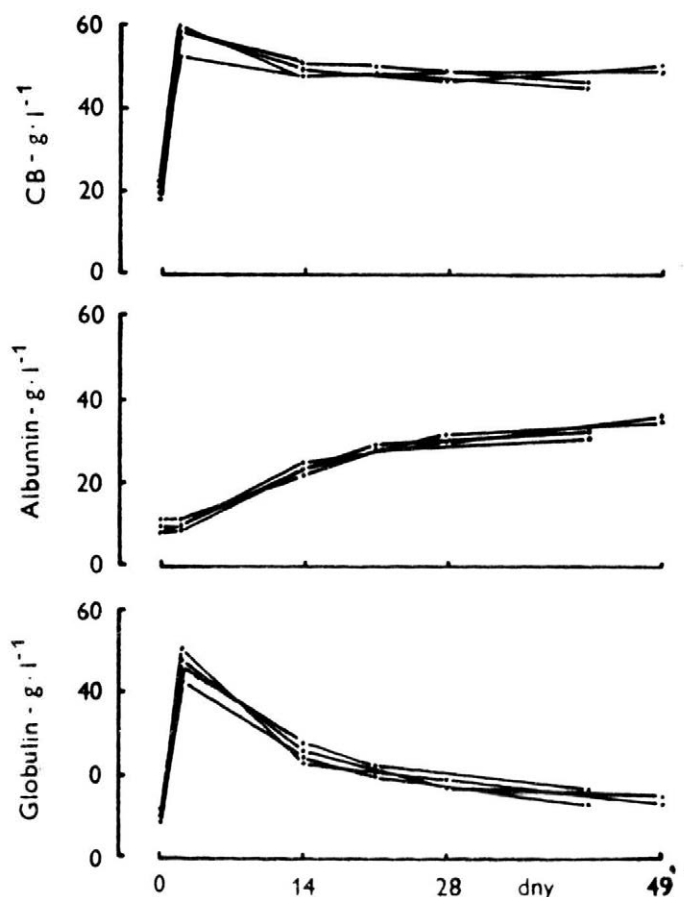
## VÝSLEDKY

Na základě tělesné hmotnosti při odstavu 28. den věku byla selata šesti vrhů prvního pokusu rozdělena na skupinu 28 selat lehčích (méně než 7,0 kg) a 28 selat průkazně ( $P < 0,01$ ) těžších. První skupina je charakterizována hmotností  $1,39 \pm 0,05$  kg druhý den po narození,  $5,83 \pm 0,19$  kg při odstavu a  $11,37 \pm 0,41$  kg za 21 den potom. Relativní přírůstek do odstavu byl 319 % a po odstavu 95 %. Skupina těžších selat vážila v tutéž dobu  $1,72 \pm 0,05$ ,  $8,17 \pm 0,19$  a  $14,47 \pm 0,65$  kg. Relativní přírůstek do odstavu byl 375 % a po odstavu 77 %.

Koncentrace celkové bílkoviny (CB) byla shodně u obou skupin nejnížší ( $20,0 \pm 0,8$  a  $19,8 \pm 1,0$  g.l<sup>-1</sup>) při narození před napitím mleziva a maxima, představujícího trojnásobek předchozí hodnoty, dosáhla již druhý den po narození. Potom se stále mírně snižovala (obr. 1). Mezi skupinami nebyly zaznamenány průkazné rozdíly. Nejnížší hodnoty byly často, ne však pravidelně, zaznamenány u selat s hmotností nižší než činil průměr skupiny.

Koncentrace albuminu v krevním séru byla u novorozených selat před napitím mleziva stejně nízká u obou skupin ( $8,9$  g.l<sup>-1</sup>) a do druhého dne věku se zvýšila jen nepatrně. Průkazný ( $P < 0,01$ ) vzestup byl zjištěn 14. den a pokračoval až do konce sledování ve věku sedmi týdnů (obr. 1). Mezi skupinami nebyly zjištěny průkazné rozdíly. Poněkud vyšší hladina při odstavu u těžších selat ( $30,8$  g.l<sup>-1</sup>) je v souladu s větším relativním přírůstkem tělesné hmotnosti v údobí sání a nižší hladina u nich než u lehčích selat za 21 den po odstavu ( $35,0$  g.l<sup>-1</sup>) s jejich

1. Koncentrace celkové bílkoviny (CB), albuminu a globulinu v krevním séru čtyř skupin selat od narození až do věku 49 dní při odstavu 28. den, nebo ve věku 42 dní při odstavu 21. den — Concentrations of total protein (CB), albumin and globulin in blood serum in four groups of piglets from birth to the age of 49 days when weaned on the 28th day or to the age of 42 days when weaned on the 21st day



menším relativním přírůstkem v tomto údobí. Nejnižší hodnoty 14 dní starých lehčích selat se vyskytly vždy u jedinců s podprůměrnou tělesnou hmotností, v jiných věkových údobích to nebylo pravidelné.

Koncentrace globulinu, nízká před napitím mleziva u skupiny lehčích i těžších selat ( $10,9 \pm 0,7$  a  $11,1 \pm 0,5$  g.l<sup>-1</sup>), dosáhla maxima ( $48,6 \pm 1,7$  a  $50,7 \pm 1,9$  g.l<sup>-1</sup>) již druhý den věku selat. Její následující pokles však byl na rozdíl od CB prudší a trvalý (obr. 1). Rozdíly mezi skupinami se shodovaly s rozdíly zjištěnými u CB a nebyly průkazné. Nízká hladina 49. dne věku se u lehčích selat již nelišila od výchozí u novorozenců, kdežto u těžších selat byla stále průkazně ( $P < 0,05$ ) vyšší ( $14,1 \pm 0,8$  g.l<sup>-1</sup>). U A/G kvocientu byly změny největší v prvních dnech po narození. Před napitím mleziva, 2., 14., 28. a 49. den činil u skupiny těžších selat 0,82, 0,21, 0,95, 1,81 a 2,48, u lehčích sourozenců 0,80, 0,20, 1,08, 1,61 a 2,76.

Ve druhém pokusu bylo 24 selat tří vrhů rozděleno na základě tělesné hmotnosti při odstavu 21. den věku z každého vrhu stejným dílem na skupinu selat lehčích (3,7–6,9 kg) a selat těžších (5,3–7,8 kg). Tělesná hmotnost skupin byla vždy průkazně rozdílná ( $P < 0,01$ ) a byla 2., 21. a 42. den: u těžších  $1,88 \pm 0,10$ ,  $6,60 \pm 0,29$  a  $10,84 \pm 0,24$  kg; u lehčích  $1,45 \pm 0,08$ ,  $5,14 \pm 0,26$  a  $8,45 \pm 0,31$  kg. Relativní přírůstek od

druhého dne po narození do odstavu byl poněkud větší u lehčích selat (254 % proti 252 %), po odstavu byl u obou skupin shodně nízký (64 %).

Změny koncentrace CB, albuminu i globulinu a A/G kvocientu během vývoje selat tohoto souboru byly časově totožné s dynamikou změn u předcházejících skupin odstavených 28. den věku. O týden dřívejší odstav poněkud ovlivnil hodnoty zjišťované za 21 den potom: hladiny CB a albuminu byly 42. den nižší než u selat odstavených 28. den (obr. 1). Koncentrace CB a globulinu byly poněkud vyšší u skupiny těžších selat, koncentrace albuminu od 15. do 42. dne byla neprůkazně vyšší u selat lehčích, s nepatrně větší růstovou intenzitou. U skupiny lehčích selat nebyl u hladiny globulinu rozdíl mezi novorozenci a 42 dny starými již průkazný. A/G kvocient byl u nich s výjimkou prvních dvou dní po narození poněkud vyšší.

U pěti skupin selat třetího pokusu nebyly při vyšetřování v intervalech dva až sedm dní v průběhu až 42 dní po odstavu sledány ve sledovaných parametrech tak výrazné změny, jako v údobí sání. U CB pokračovalo snižování její hladiny, ve srovnání s výchozí hodnotou průkazné ( $P < 0,05$ ) do 28. až 42. dne, kdy bylo zaznamenáno první menší zvýšení. Hladina albuminu se s občasným mírným kolísáním a neprůkazným poklesem zvyšovala. Naproti tomu hladina globulinu se stále snižovala a teprve 37. až 42. den byl zaznamenán první malý vzestup. A/G kvocient se zvyšoval až do 28. dne a poněkud se snížil 37. nebo 42. den při vzestupu globulinémie.

Mezi sledovanými skupinami selat byly při odstavu v tělesné hmotnosti a ve stanovených hodnotách sérových bílkovin jen poměrně malé rozdíly (tab. I). Celkový přírůstek tělesné hmotnosti za 28 dalších dní však byl u skupin č. 1 až 5 odlišný: 5,79, 8,14, 8,15, 9,14 a 9,22 kg. Prohloubily se také rozdíly u sledovaných parametrů (tab. I). Nejnižší přírůstek byl spojen s nejnižšími hladinami CB a globulinu i s jejich největším úbytkem po odstavu; byly průkazné ( $P < 0,05$ ) nižší než u nejméně dvou skupin s většími přírůstky tělesné hmotnosti. Skupina s největším přírůstkem měla ve srovnání se stavem při odstavu nejmenší snížení hladiny CB i globulinu a největší zvýšení u albuminu. U albuminémie se sice neprojevoval zcela pravidelný vztah k intenzitě tělesného růstu selat po odstavu, většinou však byla při větších přírůstcích tělesné hmotnosti vyšší.

Jak ukazují výsledky čtvrtého pokusu, nepůsobí odstav v prvních dnech velké změny. U normálně odstavených selat činil za dva dny přírůstek  $0,15 \pm 0,05$  kg. Tato selata nepřijímala mnoho potravy, jejich somatický růst se výrazně zpomalil, trend snižování hladin CB a globulinu a zvyšování u albuminu však zůstal zachován (obr. 2). Stresový stav byl prokázán u jejich sourozenců, kteří dva dny po odstavu hladověli. Tělesná hmotnost těchto selat se snížila o  $0,49 \pm 0,06$  kg. Průkazně ( $P < 0,05$ ) se u nich zvýšila koncentrace sérových kortikosteroidů, a to z  $267 \pm 6$  na  $326 \pm 21$  nmol  $\cdot$  l<sup>-1</sup>; v téže době se u selat po odstavu krmných mírně snížila z  $312 \pm 16$  na  $301 \pm 13$  nmol  $\cdot$  l<sup>-1</sup>. U selat, která po odstavu dva dny hladověla, se vedle albuminu zvýšila i koncentrace CB a globulinu (obr. 2); rozdíly nebyly statisticky průkazné.

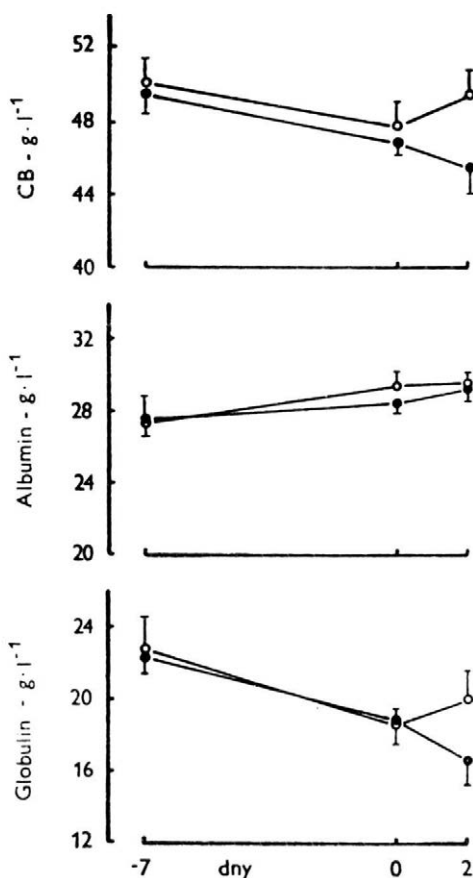
V pátém pokusu se u sajících selat za dvě hodiny po aplikaci ACTH téměř trojnásobně zvýšila koncentrace sérových kortikosteroidů, čímž

I. Tělesná hmotnost, koncentrace celkové bílkoviny (CB), albuminu a globulinu v krevním séru a albumino-globulinový kvocient (A/G) u pěti skupin selat při odstavu a za 28 dní — Body weight, concentrations of total protein (CB), albumin and globulin in the blood serum and the albumin-globulin quotient (A/G) in five groups of piglets at weaning and after 28 days

| Skupina                      | 1 (n = 6)                    | 2 (n = 14)                   | 3 (n = 13)                   | 4 (n = 6)                    | 5 (n = 5)                    |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Při odstavu                  |                              |                              |                              |                              |                              |
| hmotnost — kg                | 8,43 ± 0,56                  | 8,96 ± 0,42                  | 8,96 ± 0,61                  | 8,30 ± 0,45                  | 8,48 ± 0,39                  |
| CB — g.l <sup>-1</sup>       | 50,50 ± 3,30                 | 54,80 ± 1,10                 | 54,70 ± 1,00                 | 53,10 ± 2,60                 | 51,80 ± 1,80                 |
| albumin — g.l <sup>-1</sup>  | 28,90 ± 1,10                 | 31,00 ± 0,80                 | 31,40 ± 0,50                 | 29,00 ± 1,00                 | 29,20 ± 1,00                 |
| globulin — g.l <sup>-1</sup> | 21,60 ± 1,00                 | 23,80 ± 1,20                 | 23,30 ± 0,80                 | 24,10 ± 2,40                 | 22,60 ± 2,00                 |
| A/G                          | 1,34                         | 1,30                         | 1,35                         | 1,20                         | 1,29                         |
| 28 dní po odstavu            |                              |                              |                              |                              |                              |
| hmotnost — kg                | 14,22 ± 0,74 <sup>a</sup>    | 17,10 ± 1,07 <sup>a, b</sup> | 17,11 ± 1,15 <sup>a, b</sup> | 17,44 ± 0,80 <sup>b</sup>    | 17,70 ± 0,80 <sup>b</sup>    |
| CB — g.l <sup>-1</sup>       | 43,50 ± 1,30 <sup>a</sup>    | 48,80 ± 0,90 <sup>b</sup>    | 50,60 ± 0,80 <sup>b</sup>    | 46,80 ± 2,00 <sup>a, b</sup> | 49,50 ± 1,50 <sup>b</sup>    |
| albumin — g.l <sup>-1</sup>  | 30,60 ± 1,80 <sup>a, b</sup> | 31,50 ± 0,80 <sup>a, b</sup> | 33,50 ± 0,80 <sup>a</sup>    | 29,20 ± 1,10 <sup>b</sup>    | 32,50 ± 0,70 <sup>a, b</sup> |
| globulin — g.l <sup>-1</sup> | 12,90 ± 0,90 <sup>a</sup>    | 17,30 ± 0,80 <sup>b</sup>    | 16,90 ± 0,70 <sup>b</sup>    | 17,60 ± 1,90 <sup>a, b</sup> | 17,00 ± 1,20 <sup>b</sup>    |
| A/G                          | 2,37                         | 1,82                         | 1,98                         | 1,66                         | 1,91                         |

<sup>a, b</sup> Hodnoty označené v řádku různým písmenem jsou průkazně ( $P < 0,05$ ) rozdílné

2. Koncentrace celkové bílkoviny (CB), albuminu a globulinu v krevním séru selat před odstaven a při odstavu (0. den) a za dva dny po odstavu (vyplněné značky) nebo po hladovění (prázdné značky) — Concentrations of total protein (CB), albumin and globulin in blood serum in piglets prior to weaning and at weaning (0th day) and two days after weaning (solid symbols) or after starvation (open symbols)



II. Koncentrace celkové bílkoviny (CB), albuminu, globulinu a kortikosteroidů v krevním séru za dvě nebo 24 hodiny po aplikaci ACTH selatům ( $n = 9-10$ ) — Concentrations of total protein (CB), albumin, globulin and corticosteroids in the blood serum two or 24 hours after ACTH administration to piglets ( $n = 9-10$ )

| Pokus   | Vyšetření (hodin) | CB g.l <sup>-1</sup> | Albumin g.l <sup>-1</sup> | Globulin g.l <sup>-1</sup> | Kortikosteroidy nmol.l <sup>-1</sup> |
|---------|-------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| 1. ACTH | 0                 | 49,3 ± 1,0           | 21,1 ± 0,7                | 28,2 ± 0,8                 | 391 ± 39                             |
|         | 2                 | 48,7 ± 1,2           | 21,7 ± 0,7                | 27,0 ± 1,6                 | 1027 ± 60*                           |
|         | 2                 | 50,1 ± 1,5           | 23,0 ± 0,7                | 27,1 ± 1,5                 | 356 ± 16                             |
| 2. ACTH | 0                 | 55,0 ± 1,7           | 23,0 ± 1,7                | 32,0 ± 2,9                 | 320 ± 13                             |
|         | 24                | 57,5 ± 2,1           | 27,4 ± 1,1                | 30,1 ± 2,7                 | 370 ± 38                             |
|         | 24                | 57,0 ± 1,4           | 25,7 ± 0,9                | 31,3 ± 1,6                 | 444 ± 23                             |
| 3. ACTH | 0                 | 43,1 ± 0,9           | 24,3 ± 1,0                | 18,8 ± 0,5                 | 247 ± 12                             |
|         | 24                | 45,6 ± 1,0           | 26,5 ± 0,9                | 19,1 ± 0,4                 | 272 ± 18                             |
|         | 24                | 44,8 ± 0,7           | 25,9 ± 1,0                | 18,9 ± 0,4                 | 263 ± 27                             |

\* rozdíl proti počáteční hodnotě i kontrolní skupině průkazný ( $P < 0,01$ )

se pokusná skupina průkazně ( $P < 0,01$ ) lišila od kontrolní. Koncentrace sérových bílkovin se však nezměnila (tab. II).

U šestého pokusu lze předpokládat, že opakovaná aplikace ACTH v první den vyvolala prodloužené zvýšení adrenokortikální funkce, které za 24 hodiny po první injekci, popřípadě za 17 hodin po druhé injekci, již nebylo zjevné. Koncentrace sérových kortikosteroidů byla v tu dobu už poněkud nižší než u kontrolní skupiny (tab. II). Koncentrace CB i albuminu byla u pokusných selat za 24 hodiny zvýšená, globulinu snižena nejen v průměrech, ale i u převážné většiny jednotlivců. Rozdíly mezi počátečními nebo kontrolními hodnotami však nedosáhly průkaznosti (tab. II). A/G kvocient se zvýšil z 0,72 na 0,91, u kontrol činil 0,82.

U sedmého pokusu, metodicky stejně provedeného jako pokus druhý, ale u starších odstavených selat, byly koncentrace sérových kortikosteroidů, CB a albuminu za 24 hodiny zvýšené jak ve srovnání s výchozími hladinami, tak ve srovnání s hladinami konečnými u kontrol, rozdíly však nebyly průkazné (tab. II). A/G kvocient se u pokusných selat zvýšil z 1,24 na 1,38, u kontrol byl 1,37.

## DISKUSE

Hodnoty CB, albuminu, globulinu a A/G kvocientu, zjištěné v krevním séru prasat na různých pracovištích, se i pro určitou věkovou kategorii podstatně liší, zejména při použití odlišných způsobů vyšetření. Při jejich stanovení principiálně stejnými metodami jako v této studii je pro prasnice udáváno nebo vypočteno — ve stejném pořadí parametrů, jaké bylo uvedeno dříve: 78, 41, 37 g.l<sup>-1</sup>; A/G 1,10 (Ursache aj., 1979); 62, 39, 23 g.l<sup>-1</sup>, A/G 1,69 (Reese aj., 1984); 79,5, 40,2, 39,3 g.l<sup>-1</sup>, A/G 1,02 u primipar a 85,9, 39,2, 46,7 g.l<sup>-1</sup>, A/G 0,84 u pluripar (Raszyk aj., 1984). Nejmenší rozdíly jsou v údajích o koncentraci albuminu. Ve srovnání s hodnotami zjištěnými u dospělých prasat se výsledky dosažené v této studii u selat zásadně liší. Hladina CB a albuminu byla vždy nižší, hladina globulinu byla stejná nebo vyšší pouze druhý až 14. den po narození, ale při rychle se měnícím A/G kvocientu. Jeho hodnota je stejná nebo blízká A/G kvocientu prasníc jen před napitím mleziva, 14. až 28. den a výjimečně v druhém měsíci věku selat.

Největší fyziologické změny sérových bílkovin v životě prasete jsou v prvním měsíci. Pro přežití novorozeného selete je rozhodující příjem mleziva. Mlezivo zajišťuje také pasivní imunitu dosažením koncentrace až 31 g.l<sup>-1</sup> imunoglobulinu v krevním séru v prvních dvou dnech života; selata, která nedožijí odstavu, mají imunoglobulinu o 10 až 15 g.l<sup>-1</sup> méně (Blecha a Kelley, 1981). U námi vyšetřovaných selat se hladina sérového globulinu v průběhu dvou dnů po narození zvýšila téměř pětinašobně, v průměrech skupin na 47,6 až 50,7 g.l<sup>-1</sup>, a tvořila 80 až 84 % z cirkulujícího množství CB. Čtrnáctý den života to bylo 48 až 53 %, potom se hladina globulinu i jeho zastoupení v CB dále snižovaly spolu se zvyšujícím se A/G kvocientem. Dá se usuzovat, že v době, kdy je u selat podíl globulinu na CB vysoký, může stanovení CB dobře informovat o výši získaných imunoglobulinů, a nahradit tak v praktické diagnostice složitější laboratorní vyšetření. Stav po napití mleziva je k tomu výhodnější u selat, u nichž se koncentrace sérových

CB zvyšuje až o 303 % prekolostrální hodnoty, než u telat, u nichž zvýšení ze 47,2 na 65,3 g.l<sup>-1</sup> (Naylor aj., 1977) představuje pouze 139 %.

Koncentrace sérového albuminu nebyla u selat příjmem mleziva za první dva dny života ovlivněna a její zvyšování, plynulé v údobí sání mateřského mléka, závisí na vlastní syntéze, nesporně podmíněné nutričním stavem organismu.

K retardaci somatického růstu selat dochází pravidelně po časném odstavu od prasnice. Je způsobena zásadní změnou prostředí a hlavní roli při tom hraje změna výživy. Prvních 14 dní po odstavu se projevují výrazné metabolické změny. Hladina CB se snižuje, a to více u selat dobře rostoucích než při malých přírůstcích (Dvořák, 1979). Hladina albuminu zpravidla neklesá; při redukovaném obsahu nutričních bílkovin v krmivu byl její pokles zaznamenán až za 35 dní (Dvořák, 1981). Naproti tomu při jejich výrazně omezeném příjmu, se stagnací tělesného růstu, se koncentrace sérového albuminu snižuje rychleji (Pond a Yen, 1984). Ani v prvních dvou dnech po odstavu se albuminémie nesnížila a na poklesu CB se podílel rychlejší úbytek globulinu v krevním séru. Ten trval až do konce druhého měsíce života. Současně se albuminémie zvyšovala, ale mírněji než v údobí sání. Koncentrace CB byla pozitivně ovlivněna až při vzestupu hladiny globulinu. Změny vystihuje A/G kvocient, který se po odstavu selat zvyšoval až do doby nárůstu globulinové frakce. Teprve po zintenzívnění její syntézy se začíná A/G kvocient přibližovat k hodnotě dospělých prasat. U selat je proteinémie — s výjimkou dvou až tří týdnů po narození — charakterizována relativní hyperalbuminemií a hypoglobulinemií.

Na změnách koncentrace sérových bílkovin se vedle věkových vlivů podílejí i nutriční účinky spolu s intenzitou tělesného růstu. U selat lépe rostoucích byla většinou zjišťována vyšší albuminémie a menší A/G kvocient. Snižující se hladina globulinu a CB po odstavu je zřejmě způsobena neschopností vytvářet globuliny a dilucí jejich obsahu narůstajícím objemem krevní tekutiny. U lépe rostoucích odstavených selat byl pozorován asi o týden dřívější vzestup globulinémie než u selat hůře prosperujících. Lze usuzovat, že výživa, tělesný růst a syntéza nejen albuminu, ale i globulinu se u selat vzájemně podmiňují. Pozitivní vztah tvorby globulinu a výživy je asi působen dřívější vyžrálostí lymfocytární tkáně těžších selat. Podle dostupných údajů se tento vztah u dospělých prasat neprojevuje. Podvyživená miniaturní prasata mají více globulinu než prasata dobře krmená (Tumbleson aj., 1972). U telat a ovcí není koncentrace globulinu ovlivněna proteinovým stavem výživy (Little aj., 1977; Sykes, 1978). Obecně je albumin pokládán za základní indikátor proteinového stavu v organismu. Jeho vysoká specifita je však doprovázena poměrně malou citlivostí, která nedovoluje zaznamenat denní změny ve výživě (Ingenbleek aj., 1975).

Je překvapující, že albuminémie nebyla negativně ovlivněna při retardaci tělesného růstu selat po odstavu, nebo byla ovlivněna jen málo. Může to být dokladem vhodného složení používaného kompletního startéru ČOS 2, nicméně ani ten není zpočátku přijímán v dostatečném množství, takže může docházet k relativnímu hladovění. Ačkoli při odstavu byl v hladině albuminu zjištěn průkazný rozdíl mezi selaty těžšími a lehčími, nebylo tomu tak za 14 dní po odstavu (Dvořák, 1981),

ani v této studii mezi selaty s nejmenším a největším přírůstkem za 28 dní po odstavu. Odlišné přírůstky hmotnosti se lépe projevovaly v rozdílné globulinémii. Nelze vyloučit, že k udržení vyšší albuminémie u hůře prospívajících selat přispívá zvýšená adrenokortikální aktivita (Dvořák, 1975). Její vliv v relativně krátkodobých pokusech při stimulaci exogenním ACTH se sice nepodařilo prokázat, trend ke zvýšení koncentrace sérového albuminu je však zřetelný. Je možné, že albuminémie je pozitivně ovlivňována stresovými stavy spojenými se zvýšenou hladinou cirkulujících kortikosteroidů, ke kterým u odstavených selat působením vnějšího prostředí dochází. Při krátkodobém stresu, imitovaném jednorázovou aplikací ACTH, však za dvě hodiny nebyly změny sérových bílkovin zjištěny, což je z hlediska odběru krve k diagnostickým účelům příznivé.

## Literatura

- ATINMO, T. — BALDIJAO, C. — POND, W. G. — BARNES, R. H.: Prenatal and postnatal protein malnutrition in pigs: effects on growth rate, serum protein and albumin. *J. anim. Sci.*, **43**, 1976, s. 606-612.
- BAETZ, A. L. — MENGELING, W. L.: Blood constituent changes in fasted swine. *Amer. J. veter. Res.*, **32**, 1971, s. 1491-1499.
- BLECHA, F. — KELLEY, K. W.: Cold stress reduced the acquisition of colostral immunoglobulin in piglets. *J. anim. Sci.*, **52**, 1981, s. 594-600.
- BLUM, J. W. — KUNZ, P. — BACHMANN, C. — COLOMBO, J. P.: Metabolic effects of fasting in steers. *Res. veter. Sci.*, **31**, 1981, s. 127-129.
- CARLSSON, L. C. T. — WESTRÖM, B. R. — KARLSSON, B. W.: Intestinal absorption of proteins by the neonatal piglet fed on sow's colostrum with either natural or experimentally eliminated trypsin-inhibiting activity. *Biol. Neonate*, **38**, 1980, s. 309-320.
- COWARD, W. A. — WHITEHEAD, R. G. — LUNN, P. G.: Reasons why hypoalbuminaemia may or may not appear in protein-energy malnutrition. *Brit. J. Nutr.*, **38**, 1977, s. 115-126.
- DOORNENBAL, H. — TONG, A. K. W. — MARTIN, A. H. — SATHER, A. P.: Studies on the performance, development and carcass composition of the growing pig: effects of sex, feeding regime and age on blood serum parameter. *Can. J. anim. Sci.*, **63**, 1983, s. 977-984.
- DVOŘÁK, M.: Aktivita kůry nadledvin při odstavu selat ve srovnání se stimulací exogenním ACTH. *Veter. Med. (Praha)*, **17**, 1972, s. 671-678.
- DVOŘÁK, M.: Adrenocortical function in piglets with good and retarded growth expressed in terms of body mass. *Acta veter. (Brno)*, **44**, 1975, s. 323-334.
- DVOŘÁK, M.: Main nutrient plasma metabolite levels in piglets from birth through six weeks of age and in feeder pigs. *Acta veter. (Brno)*, **47**, 1978, s. 115-122.
- DVOŘÁK, M.: Účinky odlišného růstu odstavených selat, hladování a hormonálního působení na některé metabolické parametry v krevní plazmě. *Veter. Med. (Praha)*, **24**, 1979, s. 301-310.
- DVOŘÁK, M.: Stanovení koncentrace albuminu v krevní plazmě prasat s použitím bromkrezolové zeleně. *Veter. Med. (Praha)*, **26**, 1981, s. 481-489.
- HAKKARAINEN, J.: Developmental changes of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen in the liver, skeletal muscle, and brain of the piglet. *Acta veter. scand., Suppl.*, **59**, 1975, 198 s.
- INGENBLEEK, Y. — VAN DEN SCHRIECK, H. G. — DE NAYER, P. — DE VISSCHER, M.: Albumin, transferrin and the thyroxine-binding prealbumin/retinol-binding protein (TBPA-RBP) complex in assessment of malnutrition. *Clin. chim. Acta*, **63**, 1975, s. 61-67.
- JEŽKOVÁ, D. — PADALÍKOVÁ, D.: Changes in the blood plasma content of nitrogenous components in pregnant sows and their foetuses. *Acta veter. (Brno)*, **46**, 1977, s. 29-45.
- KARLSSON, B. W.: Fetoprotein and albumin levels in the blood serum of developing neonatal pigs. *Comp. Biochem. and Physiol.*, **34**, 1970, s. 535-546.

- LITTLE, W. — KAY, R. M. — MANSTON, R. — ROWLANDS, G. J. — STARK, A. J.: The effects of age, live-weight gain and feed intake on the blood composition of young calves. *J. agric. Sci. (Camb.)*, 89, 1977, s. 291-296.
- MASEK, J. — HOLUB, A.: Blood serum protein components in newborn piglets of different birth weights. *Acta veter. (Brno)*, 39, 1970, s. 391-395.
- MERCER, L. P. — MORGAN, P. H. — FLODIN, N. W. — EPPS, J. M.: Prediction of serum albumin levels in rats by the four-parameter model equation for nutritional responses. *Nutr. Rept. int.*, 19, 1979, s. 583-592.
- NAYLOR, J. M. — KRONFELD, D. S. — BECH-NIELSEN, S. — BARTHOLOMEW, R. C.: Plasma total protein measurement for prediction of disease and mortality in calves. *J. Amer. veter. med. Assoc.*, 171, 1977, s. 635-638.
- POND, W. G. — YEN, J. T.: Effect of protein deficiency on growth and plasma zinc concentration in genetically lean and obese swine. *J. anim. Sci.*, 59, 1984, s. 710-716.
- RASZYK, J. — DVORÁK, M.: Účinky glukózy a fenobarbitalu na koncentraci 11-hydroxykortikosteroidů v krevní plazmě selat. *Veter. Med. (Praha)*, 21, 1976, s. 61-68.
- RASZYK, J. — RUBEŠ, J. — TOULOVÁ, M. — URBANOVÁ, J. — RAŠOVSKÁ, B. — MATOUŠKOVÁ, O. — BURSA, J.: Biochemical changes in sows after eleven or more farrowings. *Physiol. bohemoslov.*, 33, 1984, s. 81-88.
- REESE, D. E. — PEO, E. R. — LEWIS, A. J. — HOGG, A.: Serum chemical values of gestating and lactating swine: Reference values. *Amer. J. veter. Res.*, 45, 1984, s. 978-980.
- RODKEY, F. L.: Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clin. Chem.*, 11, 1965, s. 478-487.
- SCHALM, O. W.: Clinical significance of plasma protein concentration. *J. Amer. veter. med. Assoc.*, 157, 1970, s. 1672-1675.
- SVENDSEN, J. — WILSON, M. R. — EWERT, E.: Serum protein levels in pigs from birth to maturity and in young pigs with and without enteric colibacillosis. *Acta veter. scand.*, 13, 1972, s. 528-538.
- SYKES, A. R.: The relationship between serum albumin concentration and body protein loss in pregnant sheep. *J. agric. Sci. (Camb.)*, 91, 1978, s. 173-179.
- THUMBLESON, M. E. — KALISH, P. R.: Serum biochemical and hematological parameters in crossbred swine from birth through eight weeks of age. *Can. J. comp. Med.*, 36, 1972, s. 202-209.
- THUMBLESON, M. E. — BURKS, M. F. — HOOK, R. R.: Serum proteins in under-nourished Sinclair (S.I) miniature swine. *Clin. Biochem.*, 5, 1972, s. 51-61.
- URSACHE, O. — QUINCHON, C. — TILLON, J. P.: Profils biochimiques chez les truies reproductrices. *Rev. Méd. vétér.*, 130, 1979, s. 1027-1037.
- YEN, J. T. — POND, W. G. — STONE, R. T.: Serum transferrin and albumin in protein-deficient young pigs. *Nutr. Rept. int.*, 25, 1982, s. 561-566.

Došlo dne 28. 10. 1985

**ДВОРЖАК, М.** (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): **Изменения концентрации белков в сыворотке крови поросят в течение их развития и в условиях стресса.** *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986 (7) : 403-414.

Концентрация всех белков (СВ), альбумина и глобулина в сыворотке крови обнаруживали в 7 испытаниях у 203 поросят — отъемышей в возрасте 3—4 недель. У новорожденных поросят до их напоения молозивом были самые низкие показатели. Через два дня повысился уровень СВ в 3 раза, у глобулина — почти в 5 раз. Потом они стали опять понижаться, наиболее у глобулина, и снижение продолжалось вплоть до конца второго месяца жизни. Альбуминемия повышалась от рождения до конца наблюдения в начале третьего месяца, без заметного влияния от приема молозива, и с пониженной интенсивностью после отъема. Альбумино-глобулиновый коэффициент, самый низкий на второй день жизни, постепенно повышался. У поросят хорошо развивающихся была в большинстве случаев обнаружена более высокая альбуминемия, а после отъема — более быстрое урегулирование гипоглобулинемии, чем у поросят плохо развивающихся. Из этого можно сделать вывод, что питание, телесный рост и синтез альбумина и глобулина у поросят взаимно обусловлены. Повышение сывороточных кортикостероидов, вызванное двухдневным голоданием, или же двухразовым применением аденокортикотропного гормона (АКТГ), вызвало недостоверное

повышение концентрации альбумина. Высокий уровень кортикостероидов через два часа после применения АСТН не сопровождался изменением белков сыворотки.

общий белок; альбумин; глобулин; кортикостероиды; рост

DVOŘÁK, M. (Veterinary Research Institute, Brno): *Changes in the Protein Concentration of the Blood Serum of Piglets during Ontogenesis and in Stress Situations.* Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 403-414.

The concentrations of total protein (TP), albumin and globulin in the blood serum were investigated in seven trials with 203 piglets weaned at the age of three to four weeks. The lowest values were recorded in the newborn piglets just before colostrum intake. Two days later the TP level was three times higher and that of globulin almost five times higher. Later the levels began to sink (more intensively in globulin) and the decrease lasted until the end of the second month of age. Albuminaemia increased from birth until the end of study (the beginning of the third month) without any greater influence of colostrum intake and at a rate reduced by weaning. The albumin-globulin quotient, the lowest on the second day of life, increased step by step. The better-growing piglets mostly had higher albuminaemia and their hypoglobulinaemia reached a normal level sooner after weaning as compared with the tail-enders. This suggests that nutrition, body growth and albumin and globulin synthesis are interdependent in piglets. An increase in serum corticosteroids induced by two days of starvation or two administrations of adrenocorticotrophic hormone, caused an insignificant increase in the concentration of albumin. Two hours after ACTH administration, the high level of corticosteroids was not observed to be accompanied by a change in serum proteins.

total protein; albumin; globulin; corticosteroids; growth

DVOŘÁK, M. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Veränderungen der Konzentration der Blutserumeiweißstoffe von Ferkeln im Verlauf ihrer Entwicklung und bei Stress.* Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 403-414.

Die Konzentration des Gesamteiweißstoffes (GE), des Albumins und des Globulins des Blutserums wurde in sieben Versuchen mit 203, im Alter von drei bis vier Wochen abgesetzten Ferkeln untersucht. Bei neugeborenen Ferkeln vor dem ersten Tränken mit Kolostralmilch lagen die Werte am niedrigsten. Nach zwei Tagen stieg das GE-Niveau dreifach an und das Globulinniveau nahezu fünffach. Danach gingen die Werte allmählich zurück, etwas stärker beim Globulin. Dieser Rückgang dauerte bis zum Ende des zweiten Lebensmonats. Die Albuminämie stieg von der Geburt an bis zum Ende der Untersuchungsperiode am Anfang des dritten Monats, ohne spürbare Auswirkung der Kolostralmilchaufnahme, jedoch mit herabgesetzter Intensität infolge des Absetzens. Der Albumin-Globulin-Quotient, der am zweiten Lebenstag am niedrigsten lag, stieg allmählich an. Bei den besser wachsenden Ferkeln wurde gegenüber den schlechter gedeihenden meist eine höhere Albuminämie und nach dem Absetzen eine raschere Regelung der Hypoglobulinämie verzeichnet. Es ist anzunehmen, daß sich Ernährung, Körperwachstum und die Albumin- sowie Globulinsynthese bei den Ferkeln gegenseitig bedingen. Eine Erhöhung der Serumkortikosteroide, die durch zweitägiges Hungern oder durch zweifache Applikation des adrenokortikotrophen Hormons (ACTH) hervorgerufen wurde, bewirkte eine nur unbedeutende Erhöhung der Albuminkonzentration. Ein hoher Kortikosteroidspiegel in zwei Stunden nach einer ACTH-Applikation rief keine Veränderung der Serumeiweißstoffe hervor.

Gesamteiweißstoffe; Albumin; Globulin; Kortikosteroide; Wachstum

---

Adresa autora:

MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

---

# DEKONTAMINACE KONTINUÁLNÍCH BUNĚČNÝCH LINIÍ SPONTÁNNĚ INFIKOVANÝCH MYKOPLAZMATY

M. Machatková, K. Jurmanová, V. Šnejdar

---

MACHATKOVÁ, M. — JURMANOVÁ, K. — ŠNEJDAR, V. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Vojenský ústav hematologie, epidemiologie a mikrobiologie, Praha): *Dekontaminace kontinuálních buněčných linií spontánně infikovaných mykoplazmaty*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 415-422. Kontinuální buněčné linie bovinních ledvin MDBK a AUBEK a prasečích ledvin RPD a IBRS, spontánně infikované *Mycoplasma arginini* a *Acholeplasma laidlawii*, byly dekontaminovány metodou selektivní eliminace. Při dekontaminaci byla použita modifikace dvou eliminačních postupů spočívajících v redukcii infekce ošetřením kultur světlem a v selekci mykoplazmat prosté buněčné populace klonováním buněk. Na základě dlouhodobé kontroly získaných buněčných klonů byl vypracován metodický postup přípravy mykoplazmat prostých buněčných linií.

bovinní ledviny; prasečí ledviny; *Mycoplasma arginini*; *Acholeplasma laidlawii*; sterilní klony

---

Mezi faktory, které významnou měrou ovlivňují kvalitu buněčných kultur a jsou častou příčinou nestandardních výsledků dosahovaných při jejich kultivaci, patří latentní kontaminace. Hlavní problém v tomto směru představují infekce buněk mykoplazmaty, ohrožující především kontinuální buněčné linie (Barile, 1977).

Pokles výskytu linií infikovaných mykoplazmaty, zaznamenaný v posledních letech ve světovém měřítku, je výsledkem systematické kontroly referenčních linií, umožňující včasnou eliminaci nebo dekontaminaci zamořených kultur přímo v bankách.

Z metod, které dosud byly v literatuře v souvislosti s dekontaminací kultur uváděny, jsou nejčastěji používány dlouhodobé kultivace infikovaných buněk v přítomnosti antibiotik nebo specifických protilátek (Mc Garrity aj., 1978; Djakonov aj., 1980; Barile, 1981; Rakovskaja aj., 1983; Adams, 1983). Méně je využívána skupina fyzikálních metod založených na poznatku, že určité druhy mykoplazmat jsou ve srovnání s buňkami savců ke změnám některých fyzikálních faktorů citlivější (Cross aj., 1967; Fogh, 1973).

V roce 1980 popsali Marcus aj. metodu, pomocí které se jim podařilo dekontaminovat buňky linie ledvin čínského křečka experimentálně infikované *M. hyorhinis* a *A. laidlawii*.

Metoda je zcela založena na schopnosti mykoplazmat zabudovat do své DNA purinové nebo pyrimidinové báze, které savčí buňky téměř neinkorporují. Její metodický základ tvoří kultivace buněk v médiu obsahujícím některý analog bází a krátkodobé vystavení kultur intenzivnímu světelnému zdroji. Mutace a zlomy vyvolané světlem v defektní DNA mykoplazmat vedou k postupné likvidaci mikroorganismů.

Účinnost metody jsme ověřovali na buňkách kontinuálních linií spontánně infikovaných *M. arginini* a *A. laidlawii* s cílem připravit sterilní buněčné substráty.

## MATERIÁL A METODY

### BUNĚČNÉ KULTURY

K dekontaminaci byly použity kultury bovinních ledvin MDBK a AUBEK a prasečích ledvin RPD a IBRS.

Buněčná linie MDBK byla získána z Americké sbírky tkáňových kultur (ATCC), zbývající kultury byly importovány z Francie. V průběhu dlouhodobé kultivace byly linie spontánně infikovány mykoplazmaty.

Buněčné linie rostly v médiu MEM-EAGLE doplněném 10 % fetálního bovinního séra, 200 m. j. penicilínu a 200 µg streptomycinu na 1 ml média.

### OŠETŘENÍ KULTUR SVĚTLEM

Experimentální kultury byly nasazeny do kultivačního média obsahujícího 30 µg 5-bromouracilu na ml (Lachema, Brno), ve kterém byly kultivovány 24 až 48 hodin. Po hodinové inkubaci s bisbenzimidem (HOECHST 33258) v koncentraci 1 µg/ml bylo kultivační médium vyměněno a buňky byly po dobu 30 minut vystaveny intenzivnímu světelnému zdroji (400 W).

Tímto způsobem byly buňky ošetřovány denně až po údobí, kdy se v kulturách objevily kolonie negativních buněk.

### KLONOVÁNÍ BUNĚK

Bezprostředně po ukončení vlastní dekontaminace byly linie klonovány. Z ošetřených kultur byly postupným ředěním připraveny suspenze obsahující v 0,1 ml média jednu nebo deset buněk. Pro klonování bylo růstové médium obohaceno glutaminem a neesenciálními aminokyselinami a buňky v něm byly kultivovány po dobu 14 až 21 dnů. Kolonie o počtu 100 až 150 buněk, tvořící se v některých iankách mikroplošty, byly potom přeneseny na plastické Petriho misky, na kterých byly kultivovány dalších pět až deset dnů. Během další kultivace bylo použito médium bez antibiotik.

### KONTROLA STERILITY

#### Fluorescenční vyšetření

Pro vyšetření kontinuálních linií v průběhu vlastní dekontaminace a kontroly připravených buněčných klonů byla použita metoda průkazu mykoplazmat bisbenzimidem Hoechst (Chen, 1977) v modifikaci popsané Machatkovou aj. (1983).

#### Kultivační vyšetření a identifikace druhů mykoplazmat

Buněčné kultury byly vyšetřeny citlivými kultivačními metodami a izolované druhy mykoplazmat byly identifikovány postupy popsanými Jurmanovou aj. (1983).

## VÝSLEDKY

### KONTAMINOVANÉ KULTURY

Spontánní infekce kontinuálních linií mykoplazmaty vyvolala v kulturách periodicky se opakující více nebo méně výrazné změny projevu, jící se především poklesem proliferační aktivity a ztrátou původní morfologie.

Stupeň těchto změn byl závislý na vnímavosti jednotlivých linií k infekci a na dynamice biologické rovnováhy v kulturách. Zatímco kultury RPD a IBRS degenerovaly během několika pasáží, přežívaly buňky bovinních linií MDBK a AUBEK po relativně dlouhé období.

Výsledkům kultivace odpovídalo i fluorescenční vyšetření, které ukázalo, že průměrný počet kolonií mykoplazmat infikujících jednu buňku byl v případě prasečích linií o několik řádů vyšší.

Kultivačními metodami bylo ve všech uvedených liniích prokázáno *M. arginini* a *A. laidlawii* v titru  $10^5$  až  $10^8$  CFU/ml.

#### OŠETŘENÍ KULTUR SVĚTLEM

Již první pokusy o dekontaminaci buněk světlem potvrdily, že uvedený způsob ošetření inhibuje rozvoj infekce v kulturách a pozitivně ovlivňuje jejich morfologii a růst.

Pokles kontaminace v opakovaně ošetřených kulturách byl nepřímo úměrný stupni zamoření výchozí buněčné populace (tab. I).

V kulturách středně kontaminované linie MDBK, ve které před dekontaminací nebyly pozorovány výrazné morfologické změny, bylo po desátém ošetření zjišťováno pouze malé množství pozitivních buněk. V silněji infikovaných kulturách linie AUBEK, ve kterých mykoplazmata vyvolávala reverzibilní cytopatický efekt, byl pokles kontaminace pozvolnější, takže po stejném počtu ozáření bylo v kulturách ještě 50 % buněk fluorescenčně pozitivních. Časově náročnější bylo ošetření masívně infikovaných linií prasečích buněk RPD a IBRS (obr. 1). Také v těchto kulturách se intenzita fluorescence po deseti ozářeních signifikantně snížila (obr. 2) a množství jednotek tvořících kolonie mykoplazmat ve vzorcích odebraných na kultivační vyšetření kleslo, počet fluorescenčně negativních buněk byl však stále nízký. Větší kolonie buněk prosté mykoplazmat se objevily teprve mezi desátým až patnáctým dnem ošetření (obr. 3) a od dvacátého dne v kulturách zcela převládly (obr. 4).

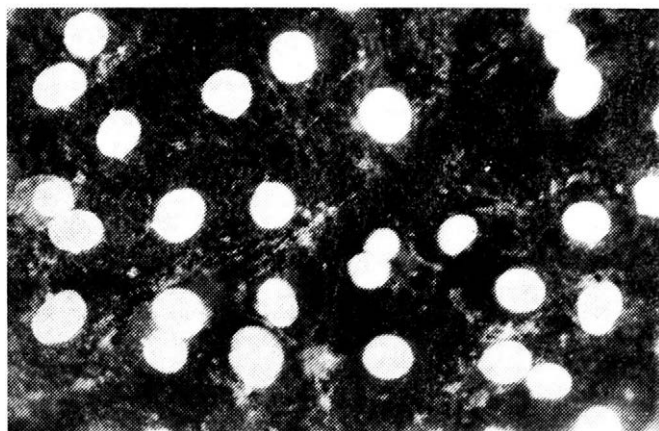
#### KLONOVÁNÍ BUNĚK

V různém stadiu dekontaminace byly kultury klonovány a odvozené buněčné klony fluorescenčně i kultivačně vyšetřeny. Počet získaných sterilních klonů koreloval s množstvím negativních buněk v ošetřených kulturách (tab. II).

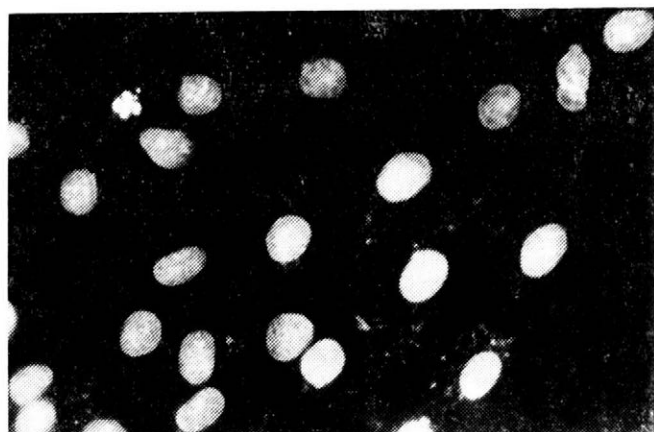
I. Dekontaminace buněčných linií působením světla — Decontamination of cell lines by the action of light

| Buněčná linie | 0    |     | 10  |     | 15   |     | 20   |     |
|---------------|------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|
|               | FV   | PI  | FV  | PI  | FV   | PI  | FV   | PI  |
| MDBK          | ++   | 2,9 | +   | 4,0 | neg. | 6,0 | neg. | 6,2 |
| AUBEK         | +++  | 1,8 | ++  | 3,2 | +    | 4,4 | neg. | 4,8 |
| RPD           | ++++ | 1,6 | ++  | 2,1 | +    | 2,4 | neg. | 3,2 |
| IBRS          | ++++ | 1,2 | +++ | 4,2 | ++   | 5,8 | neg. | 7,4 |

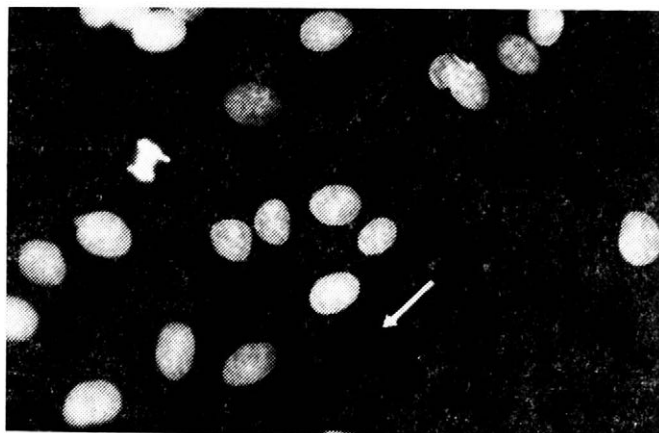
FV = fluorescenční vyšetření PI = proliferační index



1. Buňky kontinuální linie RPD masivně infikované mykoplazmaty (barveno bisbenzimididem Hoechst, původní zvětšení 400X) — Cells of the RPD continual line infected on a mass scale with mycoplasma (stained with bisbenzimidide Hoechst, original magnification 400 times)

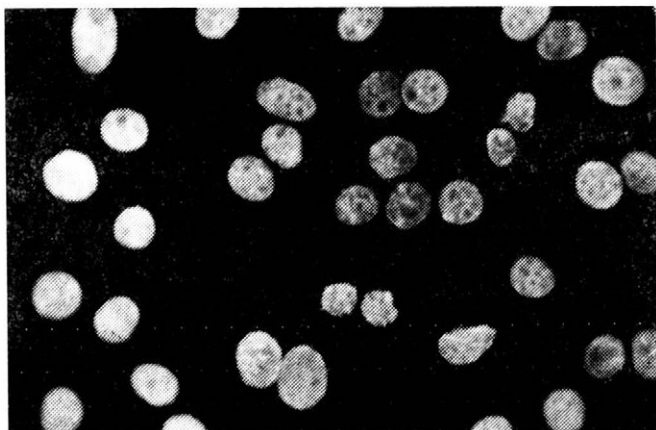


2. Pokles kontaminace v kulturách po desátém ošetření (původní zvětšení 400X) — Decrease of contamination in the cultures after the tenth treatment (original magnification 400 times)



3. Ojedinelé fluorescenčně pozitivní buňky v kulturách po 15. ošetření (původní zvětšení 400X) — Separate fluorescent-positive cells in cultures after the 15th treatment (original magnification 400 times)

4. Fluorescenčně negativní kultury linie RPD po 20. ošetření (původní zvětšení 400X) — Fluorescent-negative cultures of the RPD line after the 20th treatment (original magnification 400 times)



Nejméně klonů prostých mykoplazmat bylo získáno z buněčné linie AUBEK, ve které bylo množství infikovaných buněk po dekontaminaci ještě stále vysoké.

Relativně největší počet sterilních klonů byl připraven z linií RPD a IBRS. Na rozdíl od předcházejících kultur prodělaly tyto kultury dvojnásobný počet ošetření a v době klonování byly kultivačně i fluorescenčně negativní. Z pěti klonů derivovaných z linie RPD byly infekce prosté čtyři a ze čtrnácti klonů linie IBRS zůstaly sterilní všechny.

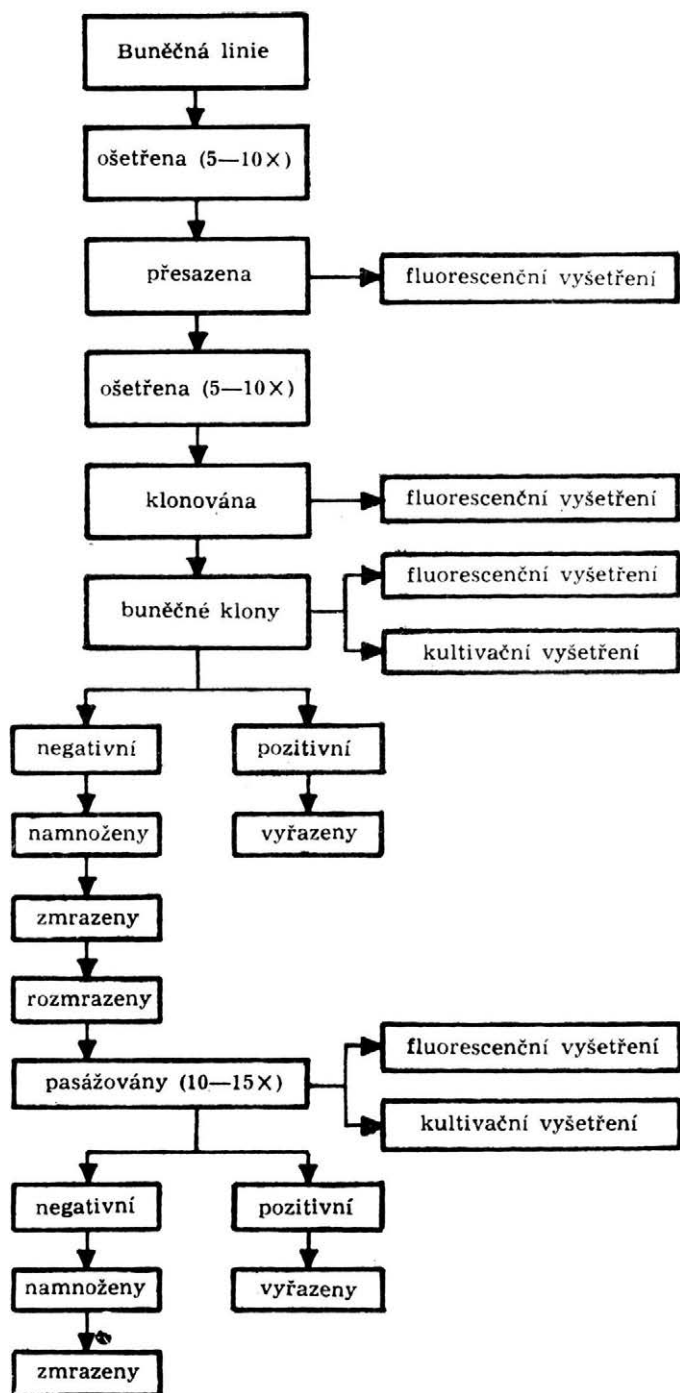
#### SELEKCE KLONŮ A JEJICH KONTROLA

Dlouhodobá kultivace kultur a kontrola jejich sterility ukázaly, že postupnou selekcí připravených klonů je možné získat sterilní buněčné linie. V neklonovaných kulturách i v některých buněčných klonech byla mykoplazmová infekce znovu prokázána mezi pátou až desátou pasáží po ukončeném ošetření a její šíření v kulturách mělo velmi rychlý průběh.

Na základě získaných výsledků byl vypracován a ověřen metodický postup pro přípravu mykoplazmat prostých linií z infikovaných substrátů (obr. 5). Podle stupně zamoření jsou buněčné linie nejdříve desetkrát až dvacetkrát ošetřeny a na základě výsledků fluorescenčního vyšetření

#### II. Klonování kultur po dekontaminaci — Clonation of cultures after decontamination

| Buněčná linie | Počet kontaminovaných buněk před dekontaminací<br>n <sub>0</sub> | Počet ošetření | Počet kontaminovaných buněk v kultuře po dekontaminaci<br>n <sub>0</sub> | Počet získaných buněčných klonů | Z toho dlouhodobě sterilních |
|---------------|------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| MDBK          | 100                                                              | 8              | 25                                                                       | 15                              | 5                            |
| AUBEK         | 100                                                              | 10             | 50                                                                       | 18                              | 3                            |
| RPD           | 100                                                              | 20             | 0                                                                        | 5                               | 4                            |
| IBRS          | 100                                                              | 30             | 0                                                                        | 14                              | 14                           |



5. Schéma přípravy sterilní buněčné linie — A diagram of the preparation of a sterile cell line

klonovány. Buňky negativních klonů jsou potom zmrazením stresovány. Po rozmrazení jsou přežívající klony krátkodobě pasážovány a opět oběma vyšetřovacími metodami kontrolovány. Kultury označené opakovaně jako negativní jsou namnoženy a konzervovány při teplotě  $-196^{\circ}\text{C}$ .

## DISKUSE

Z dosud publikovaných prací je zřejmé, že kontaminace buněčných linií mykoplazmaty představují stále závažný problém, poněvadž metody používané k jejich dekontaminaci jsou málo účinné a přinášejí relativně krátkodobý efekt. Patří mezi ně i jedna z nejčastěji používaných metod — dlouhodobá kultivace buněk v přítomnosti antibiotik. Převážná část autorů, kteří doporučují dekontaminovat buněčné linie pomocí antibiotik, připouští vysokou pravděpodobnost selekce rezistentních mykoplazmatových kmenů (Fogh, 1973; Barile, 1981; Adams, 1983). Obecnou platnost těchto poznatků potvrzují i údaje, podle kterých byl v souboru linií kultivovaných v médiu s antibiotiky výskyt mykoplazmat desetkrát vyšší než ve skupině linií rostoucích v médiu bez antibiotik (Fogh, 1973).

Aplikace vysokých teplot nebo hypotonického šoku u kontaminovaných kultur je účinná pouze u některých druhů mykoplazmat, přičemž ve všech případech negativně ovlivňuje i buňky. Také specifická antiséra proti mykoplazmatům, připravovaná nejčastěji na morčatech, často bývají pro buňky toxická (Fogh, 1973).

V našem sdělení jsou shrnuty výsledky pokusů o dekontaminaci buněčných linií postupem využívajícím odlišností metabolismu savčích buněk a mykoplazmat. K dosažení sterilní buněčné populace významně přispívá klonování buněk. Vysokou účinnost této metody potvrdili na základě cytologických, kultivačních a radioautografických vyšetření i Marcus aj. (1980) a Rottm a Marcus (1981).

Také Fowler aj. (1983), kteří srovnávali vliv různých způsobů dekontaminace na pokles mykoplazmové infekce v linii lidských jaterních buněk, označili ošetření kultur světlem jako metodu vysoce efektivní.

Naše výsledky získané v průběhu dlouhodobého sledování kultur však naznačují, že i tento způsob dekontaminace skrývá vysoké nebezpečí latentní infekce. Svědčí o tom postupný rozvoj infekce v neklonovaných kulturách i v některých klonech původně označených jako negativní.

Naproti tomu dlouhodobá kultivace zbývajících klonů potvrdila, že uvedeným postupem je možné získat sterilní buněčné linie se standardními morfologickými i růstovými vlastnostmi.

## Literatura

- ADAMS, R.: Metody kultury kletok dlja biochimikov. Moskva, Mir 1983. 263 s.  
BARILE, M. F.: Mycoplasma contamination of cell cultures: a status report. In: Action R. (Ed.) Cell cultures and its applications. New York, Academic Press 1977, s. 291-334.  
BARILE, M. F.: Mycoplasma infections of cell cultures. Israel J. med. Sci., 17, 1981, s. 555-562.  
CROSS, G. I. — GOODMAN, M. R. — SHAW, E. J.: Detection and treatment of contaminating mycoplasma in cell cultures. Austral. J. exp. Biol. med. Sci., 45, 1967, s. 201-212.

DJAKONOV, L. P. — POZDNJAKOV, A. A. — GOLOLOBOVOVA, M. T. — GRICENKO, V. V. — SUCHAREVA, N. N. — GORBATOV, V. A. — NADTOČEJ, G. A.: Metodickéskije rekomendacii po diagnostike mikoplazma-kontaminacii i dekontaminacii kletočnych kultur. Met. Rekomendacii VIEV, Moskva 1980.

FOGH, J.: Contamination in tissue culture. New York, Academic Press 1973. 288 s.

FOWLER, K. J. — BROWN, R. M. — COTTON, G. H.: Elimination of *Mycoplasma orale* from the human hepatoma cell line. Exp. Cell Res., 149, 1983, s. 303-306.

CHEN, T. R.: In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 strain. Exp. Cell Res., 104, 1977, s. 255-262.

JURMANOVÁ, K. — MACHATKOVÁ, M. — HÁJKOVÁ, M. — ČERNÁ, J. — CHLUPOVÁ, L.: Detekce mykoplazmat v buněčných kulturách. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1983. 50 s.

MACHATKOVÁ, M. — CHLUPOVÁ, L. — JURMANOVÁ, K. — HAMPL, J. — MÁDR, V.: Vývoj metod přispívajících ke standardizaci buněčných substrátů používaných ve výzkumu a diagnostice virových chorob. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1983. 50 s.

MARCUS, M. — LAVI, V. — NATTENBERG, A. — ROTTEM, S. — MARKOWITZ, O.: Selective killing of mycoplasmas from contaminated mammalian cells in cell cultures. Nature, 285, 1980, s. 659-661.

McGARRITY, G. J. — MURPHY, D. G. — NICHOLS, W. W.: Mycoplasma infection of cell culture. New York, Plenum Press, 3, 1978, s. 342.

RAKOVSKAJA, I. V. — MILLER, G. G. — JAGUŽINSKAJA, O. E.: Povedenije mikoplazm v kulture perevivajemych kletok počki embriona ovcy producirujuščich virus lejkóza. Vopr. Virusol., 6, 1983, s. 737-740.

ROTTEM, S. — MARCUS, M.: Elimination mycoplasmas from contaminated cell cultures. Israel J. med. Sci., 17, 1981, s. 569-571.

Došlo dne 3. 12. 1985

MACHATKOVA, M. — JURMANOVA, K. — SHNEJDAR, V. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно; Военный институт гематологии, эпидемиологии и микробиологии, Прага): Обеззараживание непрерывных клеточных линий, самопроизвольно зараженных микоплазмами. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 415-422.

Непрерывные клеточные линии почек крупного рогатого скота MDBK и AUBEK и почек свиней RPD и IBRS, самопроизвольно инфицированные *Mycoplasma arginini* и *Acholeplasma laidlawii*, были обеззаражены методом селекционной элиминации. При обеззараживании была использована модификация двух способов элиминации, состоящих в редукции инфекции при помощи световой обработки культур и в селекции микоплазм простой клеточной популяции, а именно, клонированием клеток. На основании длительного контроля полученных клеточных клонов был разработан методический способ подготовки микоплазм простых клеточных линий.

почки крупного рогатого скота; почки свиней; *Mycoplasma arginini*; *Acholeplasma laidlawii*; стерильные клоны

MACHATKOVÁ, M. — JURMANOVÁ, K. — ŠNEJDAR, V. (Veterinary Research Institute, Brno; Military Institute of Haematology, Epidemiology and Microbiology, Praha): Decontamination of the Continual Cell Lines Spontaneously Infected with *Mycoplasma*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 415-422.

The continual cell lines of bovine kidneys MDBK and AUBEK, and porcine kidneys RPD and IBRS, spontaneously infected with *Mycoplasma arginini* and *Acholeplasma laidlawii*, were decontaminated by the method of selective elimination. Two elimination procedures were modified to be used for the decontamination: one based on the reduction of infection by the light treatment of the cultures, the other based on the selection of mycoplasma-free cell population through cell clonation. On the basis of a long-continued control of the cell clones a methodical procedure of the preparation of mycoplasma-free cell lines was worked out.

bovine kidneys; porcine kidneys; *Mycoplasma arginini*; *Acholeplasma laidlawii*; sterile clones

#### Adresy autorů:

Ing. Marie Machatková, CSc., RNDr. Květa Jurmanová, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno  
MVDr. Vítězslav Šnejdar, Vojenský ústav hematologie, epidemiologie a mikrobiologie, U nemocnice 2, 160 00 Praha-Střešovice

# REZIDUA CHLÓROVANÝCH PESTICIDŮ A POLYCHLÓROVANÝCH BIFENYLŮ VE VEJCÍCH A TUKOVÝCH TKÁNÍCH VOLNĚ ŽIJÍCÍCH PTÁKŮ

F. Kredl, K. Křen

---

KREDL, F. — KŘEN, K. (Státní veterinární ústav, Jihlava): *Rezidua chlórovaných pesticidů a polychlórovaných bifenyků ve vejcích a tukových tkáních volně žijících ptáků*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 423-432.

V letech 1983 a 1984 bylo ve Státním veterinárním ústavu v Jihlavě vyšetřeno 129 vzorků vajec pocházejících z různých oblastí ČSR od 14 druhů volně žijících ptáků na přítomnost reziduí chlórovaných pesticidů a polychlórovaných bifenyků (PCB). Dále bylo analyzováno devět vzorků tuku jestřábů a 27 vzorků tuku kánat lesních. K analýze bylo použito metody plynové chromatografie s detektorem elektronového zachytu. Ve vyšetřených vzorcích byla zjištěna rezidua PCB, DDT a zejména jeho metabolitu DDE, dále HCB,  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH. Rezidua dalších chlórovaných uhlovodíků nalezena nebyla. Zatížení vajec i tukové tkáně jednotlivých druhů vodně žijících ptáků rezidui sledovaných látek je velmi rozdílné a pohybuje se v širokém rozmezí. Silně se uplatňuje různost potravního spektra, věk ptáků, nedostatek potravy, a tím mobilizace tukových rezerv, ale hlavně prostředí, ve kterém žijí. Nejvyšší hladiny reziduí byly nalezeny ve vejcích a tukových tkáních dravých ptáků s úzkým spektrem výživy, tj. takových, kteří se zmocňují ptáků (krahujec celkem 33,00 mg.kg<sup>-1</sup> v sušině vajec, jestřáb 239,98 mg.kg<sup>-1</sup> v tuku), nebo druhů spojených s vodním živlem (roháč potápka celkem 11,97 mg.kg<sup>-1</sup>, racek 11,24 mg.kg<sup>-1</sup> v sušině vajec). Podstatně nižší hladiny reziduí jsou u druhů žijících se převážně drobnými hlodavci (poštolka obecná celkem 0,681 mg.kg<sup>-1</sup>, káně lesní 2,456 mg.kg<sup>-1</sup> v sušině vajec a 11,398 mg.kg<sup>-1</sup> tuku). Některé vyšetřené vzorky vajec obsahovaly uhynulá embrya. U nich byly nacházeny vysoké hladiny reziduí, které často překračovaly hladiny udávané autory jako toxické.

draví ptáci; vejce; tuk; potravní spektrum

---

Znečišťování životního prostředí se s postupující chemizací a industrializací stává stále závažnějším problémem. Jedněmi z nejškodlivějších a současně i nejdéle perzistujících znečišťovenin naší biosféry jsou chlórované uhlovodíky. Jejich stanovením v ovzduší, půdě i v četných biologických materiálech se zabývá mnoho prací. V posledním období je hlavní pozornost zaměřena na nalezení tzv. ekologických indikátorů, to je stabilních složek dané krajinné oblasti, které by byly schopny reagovat na dosažený stupeň znečištění proporcionálně a jednoduše interpretovatelnou odezvou.

Jako indikátorové organismy mohou sloužit volně žijící ptáci, zejména dravci, kteří svým postavením na konci potravního řetězce kumulují ve svých tkáních a vejcích podstatně vyšší hladiny reziduí než ostatní živočichové.

Již od konce padesátých let se v odborné literatuře objevují varovné údaje o celosvětovém úbytku mnoha druhů ptáků. Ztráty zahrnují stále více druhů a přivedly některé populace ptáků až na okraj vyhynutí. Postiženi byli především draví ptáci (Paul, 1965).

V poslední době se dokonce objevují zprávy o úbytku zpěvného ptactva, které obývá rozsáhlé oblasti a jehož hustota byla značná (Hickey, 1969; Berthold, 1972; Schütz a Szijj, 1975).

Příčina úbytků spočívá vedle přímého ovlivnění člověkem (odstřel, změna biotopů, ničení hnízd, odchyt atd.) prokazatelně v mnoha případech i v negativním působení chlórovaných pesticidů, polychlórovaných bifenyly (PCB) a těžkých kovů (Moore, 1965; Presst a Ratcliffe, 1972; Rutschke, 1972; Cooke, 1973; Conrad, 1976).

Zatímco v literatuře z padesátých a šedesátých let se většina autorů zabývajících se touto problematikou zaměřila na sledování reziduí zejména DDT a jeho metabolitů i na ostatní chlórované pesticidy, v pozdější době téměř všechny práce udávají současně i hladiny reziduí PCB. Prostředí znečištěné PCB je specifickou problematikou průmyslových zemí. Jsou to látky, které se svými vlastnostmi podobají pesticidům, ze skupiny chlórovaných uhlovodíků, a proto je při plynové chromatografických vyšetřeních doprovázejí.

Vlivem reziduí chlórovaných pesticidů a PCB na ptáky se zabývalo mnoho autorů. Bylo sledováno toxické působení různých druhů PCB na mladé bažanty, divoké kachny a křepelky a bylo zjištěno, že toxicita PCB vzrůstá s procentem chlorace (Standell, 1976).

PCB jsou snadno přijímány živočišnými tkáněmi, ale vylučovány jsou velmi pomalu. Na druhé straně se PCB lehce vylučují do vajec. U ptáků krmených dietou s PCB byly nejvyšší hladiny této látky zjištěny v tukové tkáni; pak následují ledviny, játra, mozek, svaly a krev (Dahlgren aj., 1972). Na důležitost potravního spektra upozornili ve své práci Bogan a Newton (1983). Tito autoři dokázali, že existuje obrácený poměr mezi líhnivostí a obsahem chlórovaných uhlovodíků ve vejci.

PCB uložené v tukové tkáni jsou pohotově mobilizovány v průběhu stresů, které způsobují ztrátu tělesné hmotnosti. Ptáci, kteří uhynuli vyhladověním a mobilizovali předtím svoje tukové rezervy, měli vyšší hladiny PCB v mozku a ostatních tkáních než ptáci, kteří nehladověli (Lincer a Peakall, 1973). Je velmi obtížné hodnotit vliv PCB na reprodukci ptáků, ale je nutné předpokládat vážný dopad na ptačí populaci.

Ve slepičích vejcích, v nichž hladina PCB přesáhla 10 až 15 mg PCB na kilogram mokré substance, byla zjištěna silná embryotoxicita. Ta nebyla zjištěna v hladinách pod 5 mg PCB . kg<sup>-1</sup> (Standell, 1976).

Některé druhy ptáků jsou na PCB méně citlivé než kuřata slepic, například divoké kachny (Hearth aj., 1972), křepelky (Scott aj., 1975), koroptve (Hearth aj., 1972). Naproti tomu u bažantů byla hladina reziduí PCB vyvolávající poruchy reprodukce podobně vysoká jako u kuřat (Dahlgren a Lincer, 1971).

Roppe (1975) udává jako kritické množství PCB v ptačích vejcích 7,5 mg . kg<sup>-1</sup> vaječného obsahu, což odpovídá 37,5 mg . kg<sup>-1</sup> sušiny vaječného obsahu.

Údaje o hladinách reziduí v orgánech a vejcích volně žijících ptáků jsou u nás nečetné. Kredl (1972) udává hladiny reziduí chlórova-

ných pesticidů v zajících, bažantech, srnách a liškách. Koncentrace chlórovaných pesticidů u divoce žijících bažantů a u bažantů z bažantnic sledovali Mikulík a Vávrová (1977).

Podobnou tematikou se zabývali Kačmár aj. (1978) a zjistili, že hladiny reziduí jsou u volně žijících bažantů vyšší než u bažantů chovaných v bažantnicích.

Hodnoty reziduí chlórovaných pesticidů a PCB v orgánech a v tkáních několika dravých ptáků, jakož i v jejich vejcích uvádějí Kredl a Breyl (1981).

## MATERIÁL A METODA

V letech 1983 až 1984 bylo na SVÚ Jihlava vyšetřeno 129 vzorků vajec volně žijících ptáků od 14 druhů. S výjimkou vajec lysek, racků a roháčů, jež byla odebrána čerstvá z hnízd, pocházela ostatní vejce z opuštěných snůšek nebo šlo o vejce neoplozená. Vzorky vajec dravců nám byly zaslány členy Skupiny pro výzkum a ochranu dravých ptáků a sov ČSSR Východočeského kraje, zejména z okresů Rychnov nad Kněžnou a Náchod. Vejce lysek, roháčů a racků pocházela z oblasti Novomlýnské vodní nádrže v okrese Břeclav a byla nám zaslána Ústavem pro výzkum obratlovců ČSAV v Brně.

Protože stav zasláných vajec byl různý, od zcela čerstvých až po vejce zaschlá a částečně rozbitá, někdy obsahující uhynulý zárodek, byly by výsledky udávané na hmotnost substance dodaných vajec navzájem těžko srovnatelné. Proto jsme — podobně jako mnoho jiných autorů — vztáhli výsledky na sušinu obsahu vajec, která byla stanovována u každého vzorku zvlášť.

Vedle vzorku vajec byly na rezidua chlórovaných pesticidů a PCB analyzovány vzorky tuku devíti ještěřů a 27 káňat lesních. Vzorky jsme získali z Interlovu Přerov.

Rezidua chlórovaných uhlovodíků byla izolována podle Hrušky a Kociánové (1974) s rozšířením na rezidua PCB podle Kredla a Breyla (1984). Princip izolace reziduí spočívá v extrakci tuku ze vzorku společně s rezidui lipofilních pesticidů a PCB směsí aceton-petroléter a v odstranění tuku a koextrahovaných znečištěnin na sloupci florisilu.

Pro analýzy byly použity dva plynové chromatografy, a to: Varian Aerograf model 2740 s detektorem elektronového záhytu  $\text{Ni}^{63}$  a skleněnou kolonou s náplní 1,5% OV-17 + 1,95% QF-1 na Chromosorbu W 80/100 mesh pro stanovení chlórovaných pesticidů a plynový chromatograf Hewlett-Packard model 5730A se skleněnou kolonou s náplní 10% OV-101 na Gas-Chrom Q 80/100 mesh, opět s detektorem elektronového záhytu  $\text{Ni}^{63}$ , pro stanovení reziduí PCB.

Byla použita metoda absolutní kalibrace. Jako standard PCB byl použit Aroclor 1260 od fy Supelco Inc. Standardy chlórovaných pesticidů pocházely od fy Polyscience Corporation, Illinois, USA.

## VÝSLEDKY

Výsledky plynově chromatografických analýz jsou přehledně shrnuty do tab. I a II a obr. 1.

Tab. III obsahuje údaje o potravním spektru ptáků, jejichž vejce byla analyzována v rámci této práce, a to v sestupném pořadí celkových hladin reziduí — stejně jako v tab. I či v obr. 1.

## DISKUSE

Z reziduí chlórovaných uhlovodíků, která byla sledována ve vejcích a tukových tkáních volně žijících ptáků, byla — jak vyplývá z tabulek — nalezena rezidua PCB, p,p DDT a zejména jeho metabolitu p,p

I. Průměrné hladiny reziduí chlорованých pesticidů a polychlорованých bifenylov ve vejcích volně žijících ptáků (výsledky v sušině vaječného obsahu v mg.kg<sup>-1</sup>) — The average residue levels of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in the eggs of wild birds (results in the dry matter of egg contents, mg.kg<sup>-1</sup>)

| Druh            | Počet vzorků | Okres        | HCB                      | $\alpha$ -HCH             | $\gamma$ -HCH             | $\Sigma$ DDT               | PCB                        |
|-----------------|--------------|--------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Krahujec        | 24           | NA           | 0,627<br>(0,068 – 2,104) | 0,108<br>(negat. – 1,413) | 0,075<br>(negat. – 0,536) | 10,410<br>(0,564 – 41,549) | 21,784<br>(0,355 – 60,183) |
| Kalous ušatý    | 4            | NA           | 0,911<br>(0,609 – 1,423) | 0,179<br>(0,069 – 0,310)  | 0,058<br>(0,042 – 0,073)  | 2,472<br>(1,089 – 3,845)   | 13,745<br>(7,700 – 12,673) |
| Roháč potápka   | 16           | BV           | 0,075<br>(stopy – 0,155) | 0,025<br>(stopy – 0,070)  | 0,025<br>(stopy – 0,075)  | 2,495<br>(0,860 – 5,240)   | 9,350<br>(0,825 – 17,960)  |
| Moták pochop    | 2            | RK<br>NA     | 0,034<br>(stopy – 0,067) | stopy<br>(negat. – stopy) | stopy<br>(negat. – stopy) | 4,176<br>(1,407 – 6,944)   | 7,027<br>(0,692 – 13,362)  |
| Racek           | 30           | BV           | 0,403<br>(0,024 – 1,714) | 0,035<br>(stopy – 0,097)  | 0,079<br>(stopy – 0,200)  | 1,845<br>(0,124 – 4,936)   | 7,915<br>(0,682 – 40,796)  |
| Čáp bílý        | 1            | NA           | negat.                   | negat.                    | negat.                    | 3,618                      | 5,471                      |
| Ostříž          | 1            | HB           | 0,101                    | stopy                     | stopy                     | 1,355                      | 3,478                      |
| Lyska           | 27           | BV           | 0,070<br>(stopy – 0,120) | 0,035<br>(stopy – 0,145)  | 0,015<br>(stopy – 0,030)  | 1,800<br>(0,430 – 7,660)   | 2,350<br>(0,140 – 28,145)  |
| Čáp černý       | 1            | RK           | 0,023                    | 0,003                     | 0,003                     | 2,094                      | 2,090                      |
| Káně lesní      | 8            | NA           | 0,150<br>(0,061 – 0,593) | 0,001<br>(negat. – 0,004) | 0,004<br>(negat. – 0,011) | 0,495<br>(0,195 – 1,633)   | 1,806<br>(0,276 – 5,526)   |
| Včelojed        | 1            | NA           | 0,022                    | 0,066                     | 0,034                     | 0,431                      | 0,778                      |
| Puštík          | 1            | HB           | 0,059                    | stopy                     | stopy                     | 0,384                      | 0,440                      |
| Poštolka obecná | 11           | RK, NA<br>TU | 0,039<br>(stopy – 0,199) | stopy<br>(stopy – 0,001)  | 0,003<br>(negat. – 0,013) | 0,191<br>(0,035 – 0,415)   | 0,448<br>(0,093 – 0,925)   |
| Výr velký       | 2            | RK           | 0,007<br>(stopy – 0,014) | 0,007<br>(stopy – 0,014)  | 0,012<br>(stopy – 0,023)  | 0,124<br>(0,120 – 0,127)   | 0,320<br>(0,240 – 0,400)   |

II. Průměrné hladiny reziduí chlоровaných pesticidů a polychlоровaných bifenylů v tukových tkáních dravých ptáků ulovených na území CSR (výsledky v mg . kg<sup>-1</sup> tuku) — The average residue levels of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in the fatty tissues of predatory birds shot in the territory of the Czech Socialist Republic (results in mg . kg<sup>-1</sup> of fat)

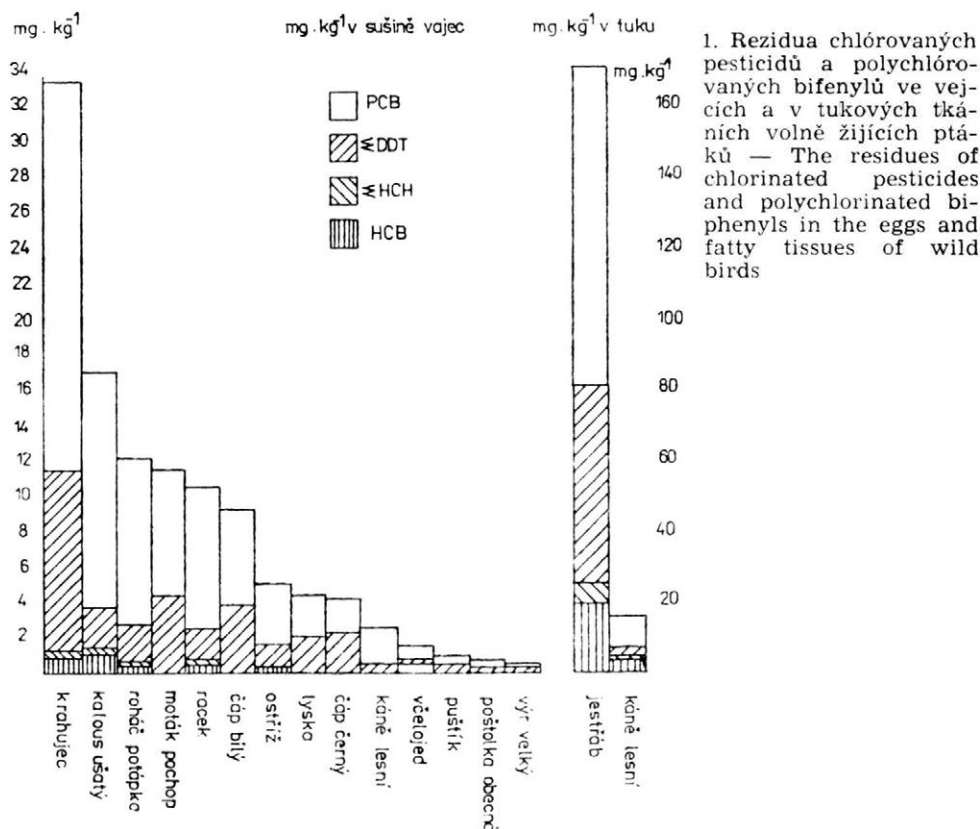
| Druh       | Počet vzorků | HCB                      | $\alpha$ -HCH           | $\gamma$ -HCH          | $\Sigma$ DDT               | PCB                        |
|------------|--------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Jestřáb    | 9            | 18,527<br>(0,132—54,240) | 1,410<br>(stopy—12,290) | 1,606<br>(0,056—9,580) | 118,358<br>(0,736—703,820) | 100,077<br>(7,021—388,032) |
| Káně lesní | 27           | 1,312<br>(stopy—10,571)  | 0,049<br>(stopy—0,240)  | 0,260<br>(stopy—2,280) | 2,200<br>(0,149—9,447)     | 7,577<br>(stopy—36,300)    |

DDE, HCB,  $\alpha$ -HCH a  $\gamma$ -HCH (lindanu). Rezidua dalších chlоровaných pesticidů zjištěna nebyla. Nebyla zjištěna ani rezidua o,p izomerů DDT a jeho metabolitů.

Jak již bylo uvedeno, vztahujeme výsledky na sušinu obsahu vajec. Tuto sušinu jsme stanovovali u každého vzorku jednotlivě. Vyjadřování nalezeného množství pesticidů na čerstvou hmotnost, jak to někdy bývá popisováno v literatuře, nám nepřipadalo příliš vhodné vzhledem k sil-

III. Potravní spektrum ptáků, jejichž vejce a tuková tkáň byly analyzovány, v sestupném pořadí zjištěných hladin reziduí chlоровaných pesticidů a polychlоровaných bifenylů — The food spectrum of the birds whose eggs and fatty tissues were analyzed, in descending order of the determined levels of residues of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls

| Druh            | Latinský název            | Hlavní složky potravy                                                        |
|-----------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Krahujec        | <i>Accipiter nisus</i>    | drobní ptáci (82—97 %) a drobní savci                                        |
| Jestřáb lesní   | <i>Astur gentilis</i>     | ptactvo a 10 % savců (veverka, zajíc, králík)                                |
| Kalous ušatý    | <i>Asio otus</i>          | drobní hlodavci (hraboši), ptáci                                             |
| Potápka roháč   | <i>Podiceps cristatus</i> | drobné rybky, vodní hmyz                                                     |
| Moták pochop    | <i>Circus aeroginosus</i> | vodní a bahenní ptáci, drobní savci, hmyz, obojživelníci                     |
| Racek chechtavý | <i>Larus ridibundus</i>   | drobné rybky, hmyz, hlodavci                                                 |
| Čáp bílý        | <i>Ciconia ciconia</i>    | drobní savci, žáby, drobné rybky, hmyz                                       |
| Ostříž lesní    | <i>Falco subbuteo</i>     | drobní ptáci, drobní savci, hmyz                                             |
| Lyska černá     | <i>Fulcia atra</i>        | vodní hmyz, červi, plži, vodní rostliny                                      |
| Čáp černý       | <i>Ciconia nigra</i>      | hlavně drobné ryby, méně ostatní živočichové                                 |
| Káně lesní      | <i>Buteo buteo</i>        | drobní hlodavci (90—97 %), drobná zvěř, obojživelníci, ptáci, hlavně mláďata |
| Včelojed lesní  | <i>Pernis apivorus</i>    | hmyz, obojživelníci, plazi                                                   |
| Poštolka obecná | <i>Falco tinniculus</i>   | drobní hlodavci, hmyz, obojživelníci                                         |
| Puštík obecný   | <i>Strix aluco</i>        | drobní hlodavci, obojživelníci, ptáci, hmyz                                  |
| Výr velký       | <i>Bubo bubo</i>          | hraboši, ježci, zajíci, ptactvo                                              |



ně kolísavému obsahu vody v dodaných vzorcích vajec. Četné pokusy se sušením obsahu vajec ukázaly, že průměrné množství vody v čerstvých vejcích činí zhruba 80 %; jestliže tedy průměrnou hodnotu vztahenou na sušinu vydělíme faktorem 5, získáme přibližnou hodnotu vztahenou na čerstvou hmotnost (Conrad, 1976).

Tento údaj byl potvrzen v Holandsku, kde Peakall aj. (1975) udávají rovněž faktor 5. Naše výsledky potvrzují správnost této hodnoty přepočítávacího faktoru.

Diagram (obr. 1) i tabulky výsledků ukazují, že zatížení vajec i tukové tkáně jednotlivých volně žijících ptáků rezidui chlорованých uhlovodíků je velmi rozdílné a pohybuje se v širokém rozmezí. Markantní je i rozdíl v úrovni hladin rezidui u tukových tkání jestřába a káněte lesního. Přitom nejvyšší hladiny u jednotlivých druhů ptáků byly zjištěny u jedinců označených jako „staří“.

Při posuzování hladin rezidui chlорованých pesticidů je zjevné, jak velkou roli hraje spektrum výživy jednotlivých druhů ptáků na ukládání rezidui do jejich tkání a vajec. Odráží se to i v našich výsledcích.

Například jestřáb se živí především ptáky. Ve střední Evropě jsou to zejména holubi a zpěvní ptáci, kteří sbírají na poli sadbové obilí donedávna mořené Agronalem H, obsahujícím HCB, a proto dodnes bývají zatíženi rezidui této látky. Proto je jestřáb v čele ptáků kontaminovaných HCB. U jestřába navíc nacházíme v tukové tkáni i vysoké hladiny sumy DDT a PCB.

Obecně jsme našli nejvyšší hladiny reziduí sumy DDT a PCB ve vejcích dravých ptáků s úzkým spektrem výživy, to je takových, kteří se zmocňují ptáků (krahujec, jestřáb atd.) či vodních ptáků (roháč, potápka, čáp). Podstatně nižší hladiny reziduí se vyskytují u druhů živících se převážně myši (káně lesní, poštolka obecná). Naše nálezy velmi dobře korelují s údaji, které publikovali Conrad (1976) a Newton (1983). Značné rozdíly v reziduích sledovaných pesticidů v tukových tkáních lze pozorovat i u jednotlivých ptáků téhož druhu. Tyto rozdíly lze vysvětlit různým věkem ptáků, prostředím, ve kterém žijí, ale také potřebou mobilizovat tukové zásoby. U hladovějících ptáků jsou zjišťovány vyšší hladiny reziduí (Lincer a Peakall, 1973).

U reziduí PCB, která se nedostávají do prostředí záměrně, jako je tomu u pesticidů, ale jako součást průmyslového znečištění, hrají roli i regionální rozdíly. Lze vystopovat předpokládané vyšší nálezy reziduí PCB v silně industrializovaných oblastech, ale počet vyšetření, která jsme dosud dělali, je prozatím příliš nízký, než aby dovozoval zmapovat naše území a formulovat obecné závěry.

Ze získaných výsledků můžeme spíše konstatovat velký vliv potravního spektra na výši hladin reziduí PCB a chlórovaných pesticidů, než podle nich posuzovat úroveň znečištění různých oblastí těmito látkami. Pro tento účel by bylo třeba analyzovat vzorky pouze vybraných dvou až tří druhů ptáků, ale z více lokalit.

Na otázku o možném toxickém působení těchto reziduí je velmi obtížné odpovědět, protože neexistuje jednotný obraz způsobený kontaminací těmito látkami. Je možné konstatovat, že například u krahujců všechna vejce obsahující uhynulá embrya (4 vzorky z 24 vyšetřených, tj. 17 %) měla hladiny sumy reziduí chlórovaných pesticidů a PCB značně vysoké (94,80; 68,10; 60,00; 49,29 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny vaječného obsahu). Je vhodné připomenout, že ptáci a ryby mají všeobecně větší schopnost kumulovat cizorodé látky než savci. Přídavek 200 mg DDT na kilogram krmiva po dobu 90 dnů způsobil, že hladina reziduí v mozku krysa dosáhla průměrně 9 mg DDT na kilogram. Stejně množství způsobilo v mozku vrabce nahromadění 129 mg DDT v kilogramu již po 49 dnech (Jefferies a Prestt, 1966).

Domníváme se, že sledování reziduí chlórovaných uhlovodíků a PCB u vybraných druhů volně žijících živočichů, doplněná o stanovení některých toxických kovů, může být cenným příspěvkem k poznání ekologických poměrů, a proto v této práci hodláme pokračovat.

## Literatura

- ANDERSON, D. W. — HICKEY, J. J.: Eggshell changes in certain North American birds. Proc. XVth int. ornitol. Congr., 1972, s. 514-540.  
BERTHOLD, P.: Über Rückgangerscheinung und deren mögliche Ursachen bei Singvögeln. Vogelwelt, 93, 1972, s. 216-226.  
BOGAN, J. A. — NEWTON, I.: The effect of organochlorine compounds on British birds of prey. Veter. Res. Commun., 7, 1983, s. 119-124.  
CONRAD, B.: Die Belastung der freilebenden Vogelwelt in der BRD mit chlorierten Kohlenwasserstoffen und PCB und deren mögliche Auswirkungen. [Inaugural-Disertation.] Köln 1976.  
COOKE, A. S.: Shell thinning in avian eggs by environmental pollutants. Envir. Poll., 3, 1973, s. 85-156.  
ČÍHAŘ, J. a kol.: Příroda v ČSSR. Praha, nakl. Práce 1976.

- DAHLGREN, R. B. — LINCER, R. L.: Effect of PCB on pheasant reproduction, behaviour and survival. J. Wildl. Mgmt., 35, 1971, s. 315-319.
- DAHLGREN, R. B. — BURY, R. J. — LINCER, R. L. — REDINGER, J. R.: Residue levels and histopathology in pheasants given PCB. J. Wildl. Mgmt., 36, 1972, s. 524-529.
- HEARTH, R. G. — SPANN, J. W. — KREUTZER, J. F. — VANCE, C.: Effect of PCBs on birds. Proc. XVth int. ornitol Congr., 1972, s. 475-485.
- HICKEY, J. J.: Peregrine falcon populations: Their biology and decline. Science, 164, 1969, s. 173-174.
- HICKEY, J. J. — ANDERSON, D. W.: Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. Science, 162, 1968, s. 271-273.
- HRUŠKA, J. — KOCIÁNOVÁ, M.: Stanovení reziduí chlorovaných pesticidů v potravinach, biologickém materiálu a vodě metodou plynové chromatografie. České Budějovice, KHES 1974.
- JEFFERIES, D. J. — PRESST, I.: Post mortems of peregrines and lanners with particular reference to organochlorine residues. Brit. Birds, 59, 1966, s. 49-64.
- JIRÁK, J. a kol.: Myslivost. Praha, Stát. zeměd. nakl. 1973.
- KACMÁR, P. — ŠAMO, A. — BLOCHOVÁ, O.: Reziduá niektorých chlórovaných pesticidov u volne žijúcich zvierat a rýb. Veter. Med. (Praha), 23, 1978, s. 737-745.
- KRATOCHVÍL, J.: Použitá zoologie — Obratlovci. Praha, Stát. zeměd. nakl. 1973.
- KREDL, F.: Prozatímní výsledky stanovení chlorovaných insekticidů v orgánech volně žijících zvířat. Folia venat., 2, 1972, s. 377-382.
- KREDL, F. — BREYL, I.: Rezidua chlorovaných pesticidů v orgánech volně žijící zvířete. Folia venat., 1981, č. 11-12, s. 143-161.
- KREDL, F. — BREYL, I.: Rychlá provozní metoda na stanovení PCB v mase a masných výrobcích. Acta epidem. microbiol., 1984, č. 10 — příloha.
- LINCER, J. L. — PEAKALL, D. B.: PCBs pharmacodynamics in the Ring Dove and early gas chromatographic peak diminution. Envir. Poll., 4, 1973, s. 59-64.
- MIKULA, A.: Zajímavosti o zvířatech. Praha, Stát. zeměd. nakl. 1965.
- MIKULÍK, A. — VÁVROVÁ, M.: Rezidua chlorovaných uhlovodíků v bažantí zvěřině. Veterinářství, 27, 1977, s. 314-316.
- MOORE, N. W.: Pesticides in birds — a review of the situation in Great Britain in 1965. Bird Study, 12, 1965, s. 222-252.
- PAUL, R. M.: The pesticides in the wildlife environment. Amer. J. publ. Health, 55, 1965, č. 7.
- PEAKALL, D. B. — CADE, T. J. — WHITE, C. M. — HAUGH, J. R.: Organochlorine residues in Alaskan peregrines. Pestic. Monit. J., 8, 1975, s. 255-260.
- PRESST, I. — RATCLIFFE, D. A.: Effect of organochlorine insecticides on European birdlife. Proc. XVth int. ornitol. Congr., 1972, s. 486-512.
- RATCLIFFE, D. A.: Decreases in eggshell weight in certain birds of prey. Nature, 215, 1967, s. 208-210.
- ROPPE, A.: Influence des PCB sur les oiseaux. Aves, 12, 1975, s. 73-83.
- RUTSCHKE, A.: Biozide und Vogelwelt. Falke, 19, 1972, s. 6-15.
- SCOTT, M. L. — ZIMMERMAN, J. L. — MARINSKY, P. S. — MÜLLENHOFF, P. A.: Effects of PCB, DDT and mercury compounds upon egg production, hatchability and shell quality in chickens and Japanese quail. Poult. Sci., 54, 1975, s. 350-368.
- STANDELL, R. C.: Summary of recent information reading effect of PCBs on birds and mammals. Wildl. Res. Center, Washington D. C., 1976, s. 262-267.
- SCHÜTZ, E. — SZIJJ, J.: Bestandsveränderungen beim Weißstorch. 5. Übersicht 1959-72. Vogelwarte, 28, 1975, s. 61-93.

Došlo dne 14. 11. 1985

КРЕДЛ, Ф. — КРЖЕН, К. (Государственный институт ветеринарии, Йиглава): **Последствия хлорированных пестицидов и полихлорированных бифенилов в яйцах и жировых тканях птиц, живущих на воле.** Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7): 423-432.

В 1983 и 1984 гг. в Государственном институте ветеринарии в Йиглаве было исследовано 129 образцов яиц птиц, живущих на воле в различных областях ЧСР, для установления последствий хлорированных пестицидов и полихлорированных бифенилов (ПХД). Далее анализировалось 9 образцов жира ястребов и 27 образцов жира канюка лесного. Для анализа был применен метод газовой хроматографии с де-

тектором электронного захвата. В исследуемых образцах были обнаружены последействия ПХД, DDT, а, главным образом, его метаболитов DDE, потом HCB,  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH. Последействия дальнейших хлорированных углеводородов обнаружены не были. Заражение яиц и жировой ткани отдельных видов живущих на воле птиц остатками исследуемых веществ весьма различно и колеблется в широком диапазоне. Здесь в глубокой мере проявляются различия в пищевом спектре, возрасте птиц, нехватке пищи, а этим и в мобилизации жировых резервов, а, главным образом, в среде обитания. Наиболее высокие величины остатков были обнаружены в яйцах и жировых тканях хищных птиц с узким пищевым спектром, т.е. таких, которые питаются птицами (ястреб — перепелятник всего 33,00 мг/кг в сухом веществе яиц, ястреб 239,98 мг/кг в жире), или видов, связанных с водной стихией (поганка всего 11,97 мг/кг, чайка 11,24 мг/кг в сухом веществе яиц). Существенно более низкие величины остатков у видов, питающихся, главным образом, мелкими грызунами (пустельга обыкновенная всего 0,681 мг/кг, канюк лесной 2,456 мг/кг в сухом веществе яиц и 11,398 мг/кг жира). Некоторые исследуемые образцы яиц содержали в себе погибшие эмбрионы. У них были найдены высокие величины остатков, которые часто превышали величины, которые авторы приводили как токсические.

хищные птицы; яйца; жир; пищевой спектр

KREDL, F. — KŘEN, K. (State Veterinary Institute, Jihlava): *Residues of Chlorinated Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in the Eggs and Fatty Tissues of Wild Birds*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 423-432.

In 1983 and 1984, in the State Veterinary Institute at Jihlava, 129 samples of eggs of wild birds of 14 species were analyzed coming from different regions of the Czech Socialist Republic for the presence of residues of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls (PCB). Apart from this, nine samples of hawk fat and 27 samples of buzzard fat were examined. The method of gas chromatography with a detector of electron capture was used for the analysis. The analyzed samples were found to contain residues of PCB, DDT (and mainly its metabolite DDE), HCB,  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH. No residues of other chlorinated carbohydrates were detected. The residue levels of these substances in the eggs and fatty tissues of different species of wild birds vary within a very wide range. A significant influence is exerted on these levels by the differences in food spectrum, the age of the birds, lack of food causing mobilization of food reserves, and mainly the environment where the birds live. The highest levels of residues were found in the eggs and fatty tissues of predatory birds with a narrow spectrum of food, i. e. those feeding on other birds (sparrow-hawk 33.00 mg.kg<sup>-1</sup> in the dry matter of eggs, hawk 239.98 mg.kg<sup>-1</sup> in fat) or those associated with water (great crested grebe 11.97 mg.kg<sup>-1</sup>, sea-gull 11.24 mg.kg<sup>-1</sup> in the dry matter of eggs). Much lower levels of the residues of the chemicals were recorded in the species feeding mainly on small rodents (kestrel 0.681 mg.kg<sup>-1</sup>, buzzard 2.456 mg.kg<sup>-1</sup> in the dry matter of eggs and 11.398 mg.kg<sup>-1</sup> in fat). Some of the samples under study contained dead embryos. These embryos had particularly high residue levels, often higher than the levels regarded in literature as toxic.

birds of prey; eggs; food spectrum

KREDL, F. — KŘEN, K. (Staatliches Veterinärinstitut, Jihlava): *Residuen von chlorierten Pestiziden und polychlorierten Biphenylen in Eiern und Fettgeweben der wildlebenden Vögel*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 423-432.

In den Jahren 1983 und 1984 wurden im Staatlichen Veterinärinstitut in Jihlava 129 Proben von Eiern aus verschiedenen CSR-Gebieten von 14 Arten der wildlebenden Vögel auf das Vorkommen der Residuen von chlorierten Pestiziden und von polychlorierten Biphenylen (PCB) untersucht. Es wurden ferner 9 Fettproben von Habichten und 27 Fettproben von Mäusebussarden analysiert. Zur Analyse wurde die Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektor herangezogen. In den untersuchten Proben wurden Residuen von PCB, DDT und insbesondere von seinem Metabolit DDE, ferner die Residuen von HCB,  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, nachgewiesen. Residuen von anderen chlorierten Kohlenwasserstoffen konnten nicht nachgewiesen werden. Die Belastung der Eier und des Fettgewebes der einzelnen freilebenden

Vögel mit Residuen der untersuchten Stoffe ist sehr unterschiedlich und schwankt in breitem Intervall. Eine grosse Rolle spielen dabei die Unterschiedlichkeit des Nahrungsspektrums, das Alter der Vögel, der Nahrungsmangel und damit auch die Mobilisierung der Fettreserven, aber hauptsächlich das Milieu, in dem die Vögel leben. Der höchste Spiegel der Residuen wurde in Eiern und Fettgeweben der wildlebenden Vögel mit einem engen Nahrungsspektrum, d. h. der Vögel die andere Vögel fressen, (Sperber insgesamt  $33,00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  in der Eiertrockensubstanz, Habicht  $239,98 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  im Fett), oder der Wasser-Vögel (Haubentaucher  $11,97 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Möwe  $11,24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  in der Eiertrockensubstanz) beobachtet. Wesentlich niedrigere Werte von Residuen gibt es bei den Vogelarten die sich überwiegend mit kleinen Nagetieren nähren (Turmfalke  $0,681 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Mäusebussard  $2,456 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  in der Eiertrockensubstanz und  $11,398 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Fett). Einige Proben der untersuchten Eier wiesen tote Embryonen auf. Bei ihnen wurden hohe Werte von Residuen beobachtet, die häufig den von verschiedenen Autoren als toxisch angegebenen Spiegel überschritten.

Raubvögel; Eier; Fett; Nahrungsspektrum

---

*Adresa autorů:*

RNDr. František K red l, MVDr. Karel K ř en, Státní veterinární ústav, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

---

# VLIV OVARIÁLNÍCH STEROIDŮ NA FARMAKOKINETIKU TERGURIDU V DĚLOZE KRYŠ

J. Lidický, J. Pícha, J. Sedláková, D. Píchová

LIDICKÝ, J. — PÍCHA, J. — SEDLÁKOVÁ, J. — PÍCHOVÁ, D. (Výzkumný ústav pro biofaktory a veterinární léčiva, Pohoří-Chotouň): *Vliv ovariálních steroidů na farmakokinetiku Terguridu v děloze kryš*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 433-441.

Inkorporace  $^3\text{H}$ -17-beta estradiolu ( $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub>) a  $^3\text{H}$ -Terguridu ( $^3\text{H}$ -Te) do dělohy pohlavně nedospělých kryš byla sledována po dobu 16 hodin po předchozím ošetření zvířat polosyntetickým námelovým alkaloidem Terguridem [kyselý maleinan N-(D-6-metyl-8-isoergolin-I-yl)-N',N'-dietylmočoviny; VÚFB-6638]. Rozdíly v inkorporaci  $^3\text{H}$ -Te v závislosti na přítomnosti ovariálních steroidů (E<sub>2</sub> a progesteronu) byly stejnou dobu sledovány u dospělých ovariektomovaných kryš. Průměrné hodnoty aktivit  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> v děloze juvenilních kryš ošetřených Terguridem byly ve všech sledovaných časových intervalech nižší než u kontrol. Toto snížení bylo statisticky významné ( $P < 0,05$ ) za osm hodin od aplikace. Časový průběh inkorporace  $^3\text{H}$ -Te v děloze pokusných a kontrolních zvířat byl obdobný. Aktivity inkorporovaného  $^3\text{H}$ -Te v děloze dospělých kryš ošetřených E<sub>2</sub> byly ve všech sledovaných časových intervalech vyšší, statisticky významné za dvě hodiny a 16 hodin ( $P < 0,05$ ) a za čtyři hodiny ( $P < 0,01$ ). Progesteron nevyvolal statisticky významné rozdíly v inkorporaci  $^3\text{H}$ -Te. Uvedené výsledky naznačují přímý vliv E<sub>2</sub> na zvýšenou inkorporaci Terguridu v děloze dospělých kryš. Pokusy na juvenilních kryších prokázaly, že se Tergurid neváže na estrogenní receptory. Snížené hmotnosti děloh juvenilních kryš ošetřených Terguridem poukazují na neschopnost buněk dělohy reagovat na exogenně podaný E<sub>2</sub>. U dospělých ovariektomovaných kryš svědčí zvýšené hmotnosti děloh po aplikaci Terguridu o synergickém účinku s E<sub>2</sub>.

inkorporace; estradiol; progesteron

Tergurid, chemicky kyselý maleinan N-(D-6-metyl-8-isoergolin-I-yl)-N',N'-dietylmočoviny (VÚFB-6638), je látka ze skupiny polosyntetických derivátů námelových alkaloidů s mnoha zajímavými účinky v oblasti endokrinního systému i v oblasti dopaminergních a serotoninergních systémů. Četné endokrinologické studie u kryš ukázaly, že Tergurid má výrazný účinek na funkci adenohipofýzy, který se projevuje inhibicí sekrece prolaktinu a vzestupem sekrece gonadotropinů [Zikán aj., 1972; Aušková aj., 1973; Řežábek aj., 1980]. V poslední době byl u skotu [Ševčík aj., 1985; Píchová aj., 1985] pozorován stimulační účinek Terguridu na sekreci nadledvinových steroidů [kortisolu, dehydroepiandrosteronu a progesteronu].

Ve veterinární praxi se využívají některé námelové alkaloidy (Ergometrin) k vyvolání kontrakcí myometria dělohy. Přesné mechanismy účinku námelových alkaloidů v děloze savců však nejsou známy. Proto jsme se rozhodli sledovat interakci mezi steroidy ovarií a radioaktivně značeným Terguridem v děloze krys.

## MATERIÁL A METODA

### MATERIÁL

6,7- $^3\text{H}$ -estradiol-17-beta (specifická aktivita 51 Ci .mmol $^{-1}$ ) byl zakoupen u firmy Amersham International plc (Amersham, Bucks, England).  $^3\text{H}$ -Tergurid-base (měrná radioaktivita 13,9 Ci .mmol $^{-1}$ ) a Tergurid-dihydrogencitrát (VÚFB 14 400) byly dodány Vědeckým ústavem pro farmacii a biochemii (Praha). Progesteron a estradiol-17-beta byly aplikovány ve specialitách Agolutin inj. a Agofolin inj.

$^3\text{H}$ -Tergurid-base byla před použitím převedena na vodorozpustnou formu  $^3\text{H}$ -Tergurid-maleinan ( $^3\text{H}$ -Te) dodáním ekvivalentního množství kyseliny maleinové.

### ZVÍŘATA

Vliv Terguridu na inkorporaci značeného 17-beta-estradiolu ( $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub>) a značeného Terguridu ( $^3\text{H}$ -Te) v děloze juvenilních krys byl sledován v pokuse A; vliv E<sub>2</sub> a progesteronu (Pg) na inkorporaci  $^3\text{H}$ -Te v děloze ovariektomovaných dospělých krys byl sledován v pokuse B.

### Pokus A

V tomto pokuse jsme použili 64 pohlavně nedospělých krysích samic kmene Wistar (Velaz, Praha) o hmotnosti 45 g, krmených Larsenovou dietou a vodou *ad libitum*. Na začátku experimentu byly krysy rozděleny do čtyř skupin, přičemž dvě skupiny sloužily jako kontroly. Oběma pokusným skupinám byl po dobu 48 hodin podáván Tergurid-dihydrogencitrát, který byl před použitím naředěn na koncentraci 1 mg .1 ml $^{-1}$ . Zvířatům byl aplikován *i. m.* dvakrát denně v dávce 0,1 ml (100  $\mu\text{g}$ ) *pro toto*. Kontroly byly paralelně ošetřeny fyziologickým roztokem. Po 48 hodinách působení Terguridu byl jedné pokusné skupině a jedné kontrolní skupině *i. m.* podán  $^3\text{H}$ -E<sub>2</sub> v dávce 2 .10<sup>6</sup> DPM *pro toto*; zbývajícím pokusným a kontrolním krysám byl *i. m.* aplikován  $^3\text{H}$ -Te v dávce 2 .10<sup>6</sup> DPM *pro toto*. Za 2, 4, 8 a 16 hodin po aplikaci radionuklidu byly krysy vždy po čtyřech kusech usmrčeny a jejich dělohy byly dále zpracovány.

### Pokus B

Do tohoto pokusu jsme použili 36 pohlavně dospělých krysích samic (hmotnost 150 g) kmene Wistar (Velaz, Praha), které byly týden před aplikací steroidů ovariektomovány. Krysy byly krmeny Larsenovou dietou a vodou *ad libitum*. Na začátku pokusu byly rozděleny do tří skupin, přičemž dvě skupiny byly určeny pro aplikaci steroidů. Progesteron (Agolutin Spofa, 30 mg .ml $^{-1}$ ) byl naředěn olejem tak, aby v 1 ml roztoku bylo obsaženo 10 mg hormonu; E<sub>2</sub> (Agofolin Spofa, 1 mg .ml $^{-1}$ ) byl zředěn na konečnou koncentraci 10  $\mu\text{g}$  .ml $^{-1}$ . E<sub>2</sub> byl krysám podáván *i. m.* jedenkrát denně v dávce 0,2 ml (2  $\mu\text{g}$  E<sub>2</sub>) *pro toto* po dobu dvou dnů. Pg byl rovněž podáván *i. m.* jedenkrát denně v dávce 0,2 ml (2 mg) *pro toto* po dva dny. Kontrolní skupině byl aplikován fyziologický roztok ve stejném objemu. Po 48 hodinách působení steroidů byl krysám *i. m.* aplikován  $^3\text{H}$ -Te v dávce 5,3 .10<sup>6</sup> DPM *pro toto*. Krysy byly usmrčovány dekapitací vždy po třech kusech ve stejných intervalech jako v pokuse A.

Radioaktivita v dělohách byla měřena metodou podle Ráže aj. (1970) takto:

Dělohy juvenilních krys, zbavené tukové a vazivové tkáně, byly po zvážení přeneseny do lékovek a zality 1 ml 25% roztoku hydroxidu draselného ve 20% etanolu; dělohy ovariectomovaných krys byly zality 2 ml uvedeného roztoku. Po úplném rozpuštění tkáně byly 100 $\mu$ l alikvoty takto vzniklých homogenátů přeneseny do scintilačních lahvíček a smíchány s 1 ml metanolu. Vzniklá směs byla přelita 5 ml SLT 31 (Spolana Neratovice) a radioaktivita byla změřena na scintilačním spektrometru Packard-Prias.

Statistické zpracování a jejich grafické znázornění bylo provedeno na počítači Hewlett-Packard.

## VÝSLEDKY

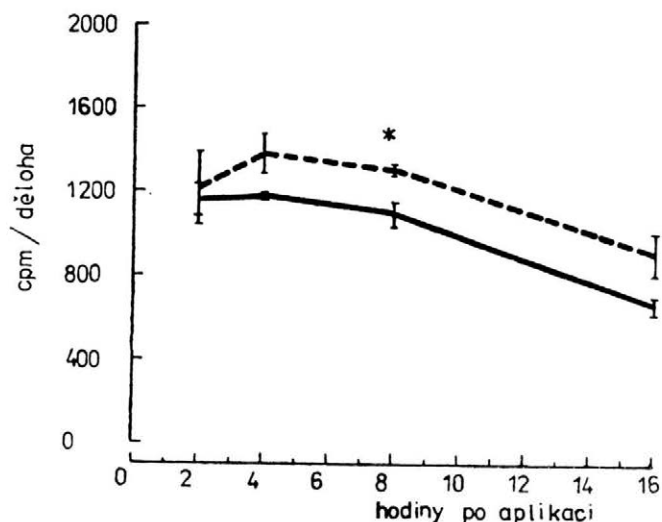
Vliv Terguridu na inkorporaci  $^3\text{H-E}_2$  v děloze juvenilních krys uvádí obr. 1. Z tohoto obrázku je zřejmé, že průměrné hodnoty aktivit  $^3\text{H-E}_2$  v děloze byly u krys ošetřených Terguridem ve všech sledovaných intervalech (2, 4, 8 a 16 hodin) nižší, přičemž statisticky významné snížení ( $P < 0,05$ ) proti kontrole bylo zjištěno za šest hodin po aplikaci  $^3\text{H-E}_2$ . Aktivita  $^3\text{H-Te}$  po aplikaci nezařazeného Terguridu v děloze juvenilních krys uvádí obr. 2. Časový průběh inkorporace  $^3\text{H-Te}$  v děloze pokusných a kontrolních zvířat byl obdobný.

Účinek  $^3\text{H-E}_2$  a  $^3\text{H-Te}$  na hmotnost děloh infantilních krys po předchozím 48hodinovém působení Terguridu demonstruje tab. I. Z této tabulky vyplývá, že u pokusných skupin krys, kterým byl před radio-

I. Vliv  $^3\text{H-17-beta-estradiolu}$  ( $^3\text{H-E}_2$ ) a  $^3\text{H-Terguridu}$  ( $^3\text{H-Te}$ ) na hmotnost dělohy juvenilních krys ošetřených Terguridem — The effect of  $^3\text{H-17-beta-estradiol}$  ( $^3\text{H-E}_2$ ) and  $^3\text{H-Tergurid}$  ( $^3\text{H-Te}$ ) on the uterus weight of juvenile rats treated with Tergurid

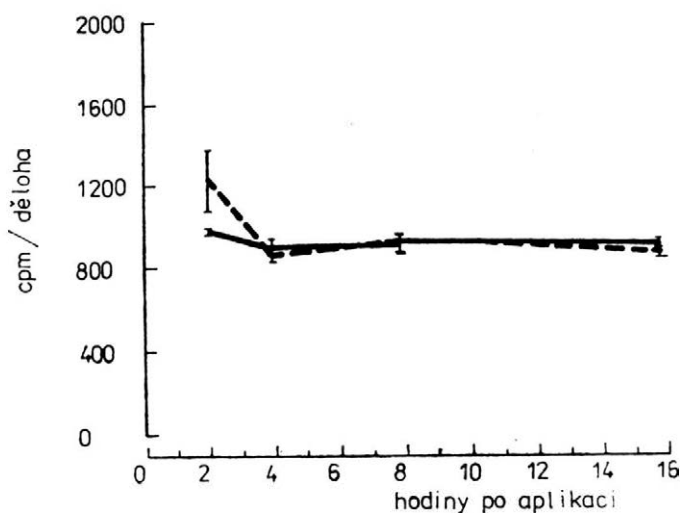
Hodnoty v tabulce představují průměry z navážek děloh získaných ze čtyř zvířat  $\pm$  SD. Statistické rozdíly mezi skupinami A vs B a C vs D byly určeny Studentovým T-testem. Ostatní údaje jsou uvedeny v popisu k obr. 1 a 2.

| Skupina<br>zvířat | Dvoudenní<br>ošetření zvířat<br>před aplikací                 | Aplikovaný<br>radionuklid<br>(dávka<br>pro toto) | Odběry tkání po aplikaci $^3\text{H-E}_2$ a $^3\text{H-T}_3$ |                 |                 |                |
|-------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
|                   |                                                               |                                                  | 2 h                                                          | 4 h             | 8 h             | 16 h           |
|                   |                                                               |                                                  | hmotnost dělohy (mg)                                         |                 |                 |                |
| A                 | fyzilogický<br>roztok                                         | $^3\text{H-E}_2$<br>( $2 \cdot 10^6$ DPM)        | $36,1 \pm 8,3$                                               | $50,8 \pm 17,9$ | $35,3 \pm 2,8$  | $44,6 \pm 9,8$ |
| B                 | Te<br>( $2 \times$ denně i. m.<br>$100 \mu\text{g}$ pro toto) | $^3\text{H-E}_2$<br>( $2 \cdot 10^6$ DPM)        | $28,8 \pm 9,8$                                               | $27,7 \pm 3,7$  | $25,7 \pm 5,5$  | $27,0 \pm 5,7$ |
| C                 | fyzilogický<br>roztok                                         | $^3\text{H-Te}$<br>( $2 \cdot 10^6$ DPM)         | $39,0 \pm 11,9$                                              | $41,9 \pm 10,4$ | $30,7 \pm 11,1$ | $29,7 \pm 7,7$ |
| D                 | Te<br>( $2 \times$ denně i. m.<br>$100 \mu\text{g}$ pro toto) | $^3\text{H-Te}$<br>( $2 \cdot 10^6$ DPM)         | $33,0 \pm 8,4$                                               | $29,8 \pm 7,3$  | $27,9 \pm 3,0$  | $27,5 \pm 6,5$ |



1. Vliv Terguridu na inkorporaci  $^3\text{H}$ -estra-  
diolu-17-beta ( $^3\text{H-E}_2$ )  
v děloze juvenilních kry-  
s — The effect of  
Tergurid on the in-  
corporation of  $^3\text{H}$ -17-  
-beta oestradiol ( $^3\text{H-E}_2$ )  
in the uteri of juvenile  
rats

Pokusné skupině krysiček samic (—) byl podáván Tergurid; kontrolní skupině (---) fyziologický roztok. Za 12 hodin po poslední aplikaci Terguridu byl oběma skupinám aplikován  $^3\text{H-E}_2$ . Hodnoty v grafu představují průměry analýz orgánů ze čtyř zvířat  $\pm$  SD. Statistické rozdíly mezi skupinami byly určeny pomocí Studentova  $T$ -testu. Průkaznost mezi skupinami: \* —  $P < 0,05$



2. Vliv Terguridu na inkorporaci  $^3\text{H}$ -Terguri-  
du v děloze juvenil-  
ních kry-  
s — The effect  
of Tergurid on the in-  
corporation of  $^3\text{H}$ -Ter-  
gurid in the uteri of  
juvenile rats

Pokusná skupina krys (—) byla ošetřena Terguridem; kontrolní skupina (---) fyziologickým roztokem. Za 12 hodin po poslední aplikaci neznačeného Terguridu byl aplikován  $^3\text{H-Tergurid}$ . Hodnoty v grafu představují průměry analýz ze čtyř orgánů  $\pm$  SD. Statistické rozdíly mezi skupinami byly určeny pomocí Studentova  $T$ -testu

II. Vliv  $^3\text{H}$ -Terguridu ( $^3\text{H}$ -Te) na hmotnost dělohy dospělých ovariektomovaných krys v přítomnosti 17-beta-estradiolu ( $\text{E}_2$ ) a progesteronu (Pg) — The effect of  $^3\text{H}$ -Tergurid ( $^3\text{H}$ -Te) on the uterus weight in adult ovariectomized rats in the presence of 17-beta oestradiol ( $\text{E}_2$ ) and progesterone (Pg)

Hodnoty v tabulce jsou průměry z navážek děloh zjištěných u tří zvířat  $\pm$  SD. Statistické rozdíly mezi skupinami byly určeny Studentovým  $T$ -testem. Detaily jsou uvedeny v popisu k obr. 3.

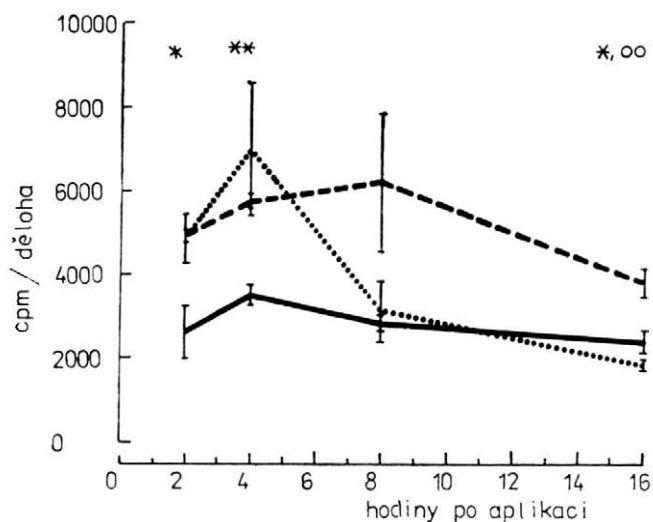
| Dvoudenní ošetření zvířat před aplikací radionuklidu                 |                                             | Aplikovaný radionuklid (dávka pro toto) | Odběry tkání po aplikaci $^3\text{H}$ -Te |                                   |                                |                                     |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
|                                                                      |                                             |                                         | 2 h                                       | 4 h                               | 8 h                            | 16 h                                |
|                                                                      |                                             |                                         | hmotnost dělohy (mg)                      |                                   |                                |                                     |
| Kontrolní skupina — K                                                |                                             |                                         |                                           |                                   |                                |                                     |
| Fyziologický roztok                                                  | $^3\text{H}$ -Te<br>5,3.10 <sup>6</sup> DPM |                                         | 98,8 $\pm$ 18,4                           | 124,4 $\pm$ 5,8                   | 129,1 $\pm$ 21,6               | 250,0 $\pm$ 35,6 <sup>aa)</sup>     |
| Pokusná skupina — $\text{E}_2$                                       |                                             |                                         |                                           |                                   |                                |                                     |
| $\text{E}_2$<br>(1 $\times$ denně i. m.<br>2 $\mu\text{g}$ pro toto) | $^3\text{H}$ -Te<br>5,3.10 <sup>6</sup> DPM |                                         | 282,3 $\pm$ 40,1 <sup>o)</sup>            | 358,8 $\pm$ 46,6 <sup>o) b)</sup> | 718,2 $\pm$ 351,1 <sup>+</sup> | 1104,8 $\pm$ 453,5 <sup>o) b)</sup> |
| Pokusná skupina — Pg                                                 |                                             |                                         |                                           |                                   |                                |                                     |
| Pg<br>(1 $\times$ denně i. m.<br>20 mg pro toto)                     | $^3\text{H}$ -Te<br>5,3.10 <sup>6</sup> DPM |                                         | 123,0 $\pm$ 49,2                          | 241,8 $\pm$ 73,8                  | 203,4 $\pm$ 117,9              | 147,5 $\pm$ 14,5                    |

Studentův  $T$ -test:

K vs  $\text{E}_2$ : <sup>o)</sup>  $P < 0,05$ ; <sup>++)</sup>  $P < 0,01$ ;  $\text{E}_2$  vs Pg: <sup>o)</sup>  $P < 0,05$ ; K 2h vs K 16h: <sup>aa)</sup>  $P < 0,01$ ;  
 $\text{E}_2$  2h vs  $\text{E}_2$  4h: <sup>b)</sup>  $P < 0,05$ ;  $\text{E}_2$  2h vs  $\text{E}_2$  16h: <sup>b)</sup>  $P < 0,05$

nuklidy podáván Tergurid, byla vždy naměřena menší hmotnost. Tento rozdíl však ani u jedné z pokusných skupin nebyl v porovnání s kontrolou průkazný.

Vliv steroidů (Pg a  $\text{E}_2$ ) na inkorporaci  $^3\text{H}$ -Te v děloze ovariektomovaných dospělých krys uvádí obr. 3. Průměrné aktivity  $^3\text{H}$ -Te byly v děloze krys ošetřených  $\text{E}_2$  vyšší než u kontroly; statisticky významné rozdíly byly zaznamenány za dvě a 16 hodin po aplikaci radioligandu ( $P < 0,05$ ) a za čtyři hodiny ( $P < 0,01$ ). Progesteron sice zvýšil v prvních čtyřech hodinách množství  $^3\text{H}$ -Te, ale toto zvýšení nebylo statisticky významné. Za 16 hodin po aplikaci  $^3\text{H}$ -Te bylo zaznamenáno snížení pod hladinu kontroly. Průměrná hmotnost děloh ovariektomovaných kontrolních krys činila za dvě hodiny po aplikaci  $^3\text{H}$ -Te 98,8  $\pm$  18,4 mg (tab. II). Na konci experimentu (16 hodin po aplikaci  $^3\text{H}$ -Te) stoupla průměrná hmotnost na 250,0  $\pm$  35,6 mg, což představuje statisticky velmi průkazný rozdíl ( $P < 0,01$ ). Zvýšení hmotnosti pozorované za čtyři a osm hodin po aplikaci  $^3\text{H}$ -Te nepředstavuje statisticky významný rozdíl. Obdobně u pokusné skupiny ošetřené 48 hodin estradiolem byl sledován po aplikaci  $^3\text{H}$ -Te nárůst hmotnosti dělohy. Statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) byl zjištěn mezi hmotnostmi v časových pulsech 16 hodin (1104,8  $\pm$  453,5 mg) a dvě hodiny (282,3  $\pm$  40,1 mg) po aplikaci  $^3\text{H}$ -Te.



3. Vliv progesteronu (Pg) a estradiolu-17-beta (E<sub>2</sub>) na inkorporaci <sup>3</sup>H-Terguridu v děloze dospělých ovariectomovaných krys — The effect of progesterone (Pg) and 17-beta oestradiol (E<sub>2</sub>) on the incorporation of <sup>3</sup>H-Tergurid in the uteri of adult ovariectomized rats

Pokusným skupinám kryších samic (hmotnost 150 g) byl aplikován Pg (....) a E<sub>2</sub> (---); kontrolní skupině (—) byl podáván fyziologický roztok. Za 12 hodin po poslední aplikaci steroidů byl všem skupinám podán <sup>3</sup>H-Tergurid. Hodnoty v grafu představují průměry naměřených hodnot z orgánů tří zvířat ± SD. Statistické rozdíly mezi skupinami byly určeny pomocí Studentova T-testu. Průkaznost mezi skupinami: \*, \*\* — kontrola vs E<sub>2</sub>: \* ( $P < 0,05$ ); \*\* ( $P < 0,01$ ), oo — Pg vs E<sub>2</sub> ( $P < 0,01$ )

U skupiny krys ošetřené progesteronem bylo po aplikaci <sup>3</sup>H-Te zpočátku sledováno zvýšení hmotnosti (2, 4 a 8 hodin) a později snížení hmotnosti (16 hodin); rozdíly v hmotnostech však nebyly statisticky významné. Vzájemným porovnáním hmotností obou pokusných skupin (E<sub>2</sub> versus Pg) byly ve dvou, čtyřech a 16 hodinách zaznamenány průkazně vyšší hmotnosti ( $P < 0,05$ ) u skupiny E<sub>2</sub> proti skupině Pg.

## DISKUSE

Typický průběh inkorporace radioaktivně značeného 17-beta estradiolu v děloze juvenilních krys (obr. 1) je podmíněn přítomností specifických vazebných míst (receptorů) pro estrogeny (Jensen a Jacobson, 1960; Jensen a DeSombre, 1972). Sníženou inkorporaci <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> u zvířat ošetřených Terguridem lze vysvětlit jeho schopností snižovat jak bazální, tak estradiolem zvýšenou koncentraci cytoplazmatických receptorů na estradiol (Lidický aj., 1985b). Mechanismus, kterým dochází k uvedenému snížení koncentrace receptorů, není doposud znám. Z průběhu inkorporace samostatně podaného <sup>3</sup>H-Te (obr. 2), při němž nebyla pozorována saturační fáze, lze soudit, že estrogení receptor nemá vazebnou afinitu k Terguridu a že tudíž možnost kompetitivní inhibice je nepravděpodobná. Výsledky získané v experimentech na jalovicích (Píčová aj., 1985) však dokumentují statistické zvýšení hladin kortisolu v krevní plazmě za dvě hodiny po podání Terguridu. Zvýšené hladiny glukokortikoidů pak mohou v děloze

snížovat koncentraci estrogenních receptorů. Tato závislost byla zjištěna v experimentech na infantilních krysách po aplikaci dexametazonu (Lidický aj., 1982, 1985a).

Přímý vliv E<sub>2</sub> na průkazně zvýšenou inkorporaci <sup>3</sup>H-Te v děloze ovariektomovaných krys pravděpodobně souvisí se zahájením proteosyntézy (Hamilton, 1963; Noteboom a Gorski, 1963). Lze předpokládat, že určitá analoga nově syntetizovaných proteinů mohou námellové alkaloidy vázat. Zajímavý průběh inkorporace <sup>3</sup>H-Te v děloze pod vlivem progesteronu svědčí o rychlejší eluci Terguridu z buněk dělohy, než je tomu u estradiolu. Vysvětlení tohoto jevu může souviset se schopností progesteronu inhibovat některé vazebné proteiny (McDonald aj., 1982; Lidický aj., 1985a) a dále s jeho rychlou degradací v děložních buňkách.

Snížené hmotnosti děloh juvenilních krys ošetřených Terguridem poukazují na neschopnost děložních buněk reagovat na exogenně podaný <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>. Zastavení této reakce bude pravděpodobně souviset s omezenou inhibicí vody do tkáně, která podstatně ovlivňuje hmotnost dělohy. Zcela opačný závěr lze učinit z výsledků děložních hmotností ovariektomovaných krys. Tyto výsledky naznačují, že Tergurid je synergickým faktorem estradiolu, neboť po podání <sup>3</sup>H-Te se u kontrolních krys statisticky významně zvýšila děložní hmotnost za 16 hodin po aplikaci uvedeného radioligandu. Obdobně u pokusné skupiny, která byla předem ošetřena estradiolem, bylo možné sledovat stimulační efekt Terguridu na působení estradiolu. Tento efekt se projevil dalším zvýšením hmotnosti tkáně. Stimulační účinek Terguridu na tvorbu nitroděložní tekutiny u dospělých krys studovali Černý aj. (1985). V jejich experimentech byl objem nitroděložní tekutiny u pokusné skupiny ošetřené Terguridem vyšší než u skupiny kontrolní. Podobně u skupiny ošetřené kombinací estrogenů a Terguridu byl obsah tekutiny prokazatelně vyšší než u skupiny ošetřené samotnými estrogeny.

## Literatura

- AUŠKOVÁ, M. — ŘEŽÁBEK, K. — SEMONSKÝ, M.: Laktations-Hemmung bei der Ratte nach D-6-Methyl-8-ergolin-I-yl-essigsäureamid-Tartarat (VÚFB 6683) *Arzneimittelforschung*, 4, 1973, s. 617-618.
- ČERNÝ, A. a kol.: Prostředek pro léčení endometritid u savčích samic. Patent ČSSR 4246-85, 12. 6. 1985.
- HAMILTON, T. H.: Isotopic studies on estrogen-induced accelerations of ribonucleic acid and protein synthesis. *Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 49, 1963, s. 373-379.
- JENSEN, E. V. — JACOBSON, H. I.: Fate of steroid estrogen in target tissues. In: *Biological activities of steroids in relation to cancer*. G. Pincus, E. P. Vollmer (eds.). New York, Academic Press 1960, s. 161-178.
- JENSEN, E. V. — SOMBRE, E. R. De: Mechanism of action of the female sex hormones. *A. Rev. Biochem.*, 41, 1972, s. 203-230.
- LIDICKÝ, J. — ŠKARDA, J. — URBANOVÁ, E.: Vliv estradiolu, progesteronu a dexametazonu na růst dělohy u krys. Připraveno do tisku, 1985a.
- LIDICKÝ, J. — ŠKARDA, J. — SNOCHOWSKI, M. — URBANOVÁ, E.: Vliv prolaktinu a Terguridu na koncentraci receptorů na estradiol v cytosolu dělohy krys. *Biol. a Chem. Veter.*, 3, 1985b, s. 273-280.
- LIDICKÝ, J. — ŠKARDA, J. — URBANOVÁ, E. — LEAKE, R. E. — COWAN, S. — BÍLEK, J.: Účinek estradiolu, progesteronu a dexametazonu na koncentraci receptorů na estradiol a progesteron v cytosolu dělohy krys. *Českoslov. Fysiol.*, 31, 1982, s. 469.

McDONALD, R. G. — OKULICZ, W. C. — LEAWITT, W. W.: Progesterone induced inactivation of nuclear estrogen receptor in the hamster uterus is mediated by acid phosphatase. *Biochim. biophys. Res. Commun.*, 104, 1982, s. 570-576.

NOTEBOOM, W. D. — GORSKI, J.: An early effect of estrogen on protein synthesis. *Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 50, 1963, s. 250-255.

PÍCHOVÁ, D. — ŠEVČÍK, B. — KRÁL, J. — BÍLEK, P. — PÍCHA, J. — BOROVIČKA, A.: Změny v koncentraci gonadotropních hormonů, ovariálních a nadledvinových steroidů po aplikaci Terguridu jalovicím v období ontogeneze. *Biol. a Chem. Veter.*, 3, 1985, s. 219-238.

RAŽ, K. — FRANCOVÁ, V. — FRANC, Z. — ČERNÝ, A. — JELÍNEK, V. — SEMONSKÝ, M.: Biochemistry of drugs XVI. Substances with antineoplastic effect XXXVI. Absorption, tissue distribution and excretion of ethylester N-(6-purinothio)valeryl/glycylglycine-<sup>35</sup>S (Butodicine) in mice with Crockeris sarcoma 180. *Neoplasma*, 17, 1970, s. 37-42.

ŘEŽÁBEK, K.: Dironyl (VÚFB 6638). Předklinické farmakologické poznatky. [Závěrečná zpráva.] Praha, VÚFB 1980. 158 s.

ŠEVČÍK, B. — PÍCHOVÁ, D. — BOROVIČKA, A. — BÍLEK, P. — KRÁL, L. — PÍCHA, J.: Vliv Terguridu na sekreci gonadotropních a ovariálních hormonů v pohlavním cyklu u jalovic. *Biol. a Chem. Veter.*, 3, 1985, s. 199-217.

ZIKÁN, V. — SEMONSKÝ, M. — ŘEŽÁBEK, K. — AUŠKOVÁ, M. — ŠEDA, M.: Ergot alkaloids. XI. Some N-(D-6-methyl-8-isoergolin-I-yl) and N-(D-6-methyl-8-isoergolin-II-yl)-N-substituted ureas. *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, 37, 1972, s. 2600-2605.

Došlo dne 29. 10. 1985

ЛИДИЦКИ, Я. — ПИХА, Й. — СЕДЛАКОВА, Й. — ПИХОВА, Д. (Научно-исследовательский институт биофакторов и медикаментов, Погоржи-Хотоуны): Влияние овариальных стероидов на фармакокинетику Тергурида в матке крыс. *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986 (7) : 433-441.

Инкорпорация <sup>3</sup>H-17-бета эстрадиола (<sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>) и <sup>3</sup>H-Тергурида (<sup>3</sup>H-Te) в матку не достигших сексуальной зрелости крыс исследовалась в течение 16 часов после предшествовавшей обработки животных полусинтетическим алкалоидом спорыньи Тергуридом (кислый малеат N-(D-6-метил-8-изоэрголин-I-yl)-N', N'-диэтилмочевины; VÚFB-6638). Различия в инкорпорации <sup>3</sup>H-Te в зависимости от присутствия овариальных стероидов (E<sub>2</sub> и прогестерона) исследовались одинаковый период времени у взрослых крыс с удаленными яичниками. Средние величины активности <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> в матке ювенильных крыс, обработанных Тергуридом, во всех исследуемых интервалах времени были более низкими по сравнению с контролем. Это снижение было статистически значимым (P < 0,05) через 8 часов после его введения. Развитие инкорпорации <sup>3</sup>H-Te во времени в матке опытных и контрольных животных проходило аналогично. Активность инкорпорированного <sup>3</sup>H-Te в матке взрослых крыс, обработанных E<sub>2</sub>, во всех исследуемых интервалах времени была более высокая, статистически значима через 2 часа и 16 часов (P < 0,05) и через 4 часа (P < 0,01). Прогестерон не вызвал статистически значимых различий в инкорпорации <sup>3</sup>H-Te. Приведенные результаты показывают прямое влияние E<sub>2</sub> на повышенную инкорпорацию Тергурида в матку взрослых крыс. Опыты с ювенильными крысами показали, что Тергурид не связан с эстрогенными детекторами. Снижение массы маток ювенильных крыс, обработанных Тергуридом, указывает на неспособность клеток матки реагировать на экзогенно введенный E<sub>2</sub>. У взрослых крыс с удаленными яичниками увеличение массы матки после введения Тергурида свидетельствует о синергитическом действии с E<sub>2</sub>.

инкорпорация; эстрадиол; прогестерон

LIDICKÝ, J. — PÍCHA, J. — SEDLÁKOVÁ, J. — PÍCHOVÁ, D. (Research Institute for Biofactors and Veterinary Drugs, Pohoří-Chotouň): The Effect of Ovarial Steroids on the Pharmacokinetics of Tergurid in the Uterus of Rats. *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986 (7) : 433-441.

The incorporation of <sup>3</sup>H-17-beta oestradiol (<sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>) and <sup>3</sup>H-Tergurid (<sup>3</sup>H-Te) in the uteri of sexually immature rats was monitored for 16 hours following the treatment of the animals with Tergurid, a semisynthetic ergot alkaloid [chemically acid

N-(D-6-methyl-8-isoergolin-I-yl) — N',N'-diethylurea maleate; VÚFB-6638]. The differences in the incorporation of  $^3\text{H}$ -Te in relation to the presence of ovarian steroids ( $\text{E}_2$  and progesterone) were investigated for the same period of time in the adult ovariectomized rats. In all the time intervals under study, the average values of  $^3\text{H}$ - $\text{E}_2$  activities in the uteri of juvenile rats treated with Tergurid were lower than in the controls. This decrease was statistically significant ( $P < 0.05$ ) eight hours after treatment. The time course of the incorporation of  $^3\text{H}$ -Te in the uteri of the experimental and control animals was about the same. The activities of incorporated  $^3\text{H}$ -Te in the uteri of adult rats treated with  $\text{E}_2$  were higher in all the intervals, the difference being statistically significant after two hours and 16 hours ( $P < 0.05$ ) and after four hours ( $P < 0.01$ ). Progesterone did not induce any significant differences in the incorporation of  $^3\text{H}$ -Te. These results suggest that the increased incorporation of Tergurid in the uteri of adult rats is due to a direct influence of  $\text{E}_2$ . It has been demonstrated by trials on juvenile rats that Tergurid does not combine with oestrogenic receptors. As suggested by the decreased weights of the uteri of juvenile rats treated with Tergurid, the uterine cells are unable to react to exogenous administration of  $\text{E}_2$ . In the adult ovariectomized rats, the increased weights of uteri after Tergurid administration testify to a synergetic action with  $\text{E}_2$ .

incorporation; oestradiol; progesterone

LIDICKÝ, J. — PÍCHA, J. — SEDLÁKOVÁ, J. — PÍCHOVÁ, D. (Forschungsinstitut für Biofaktoren und Veterinärarzneimittel, Pohoří-Chotouň): *Einfluss der ovariellen Steroide auf die Pharmakokinetik von Tergurid in der Gebärmutter der Ratten*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 433-441.

Die Inkorporation von  $^3\text{H}$ -17-Beta Östradiol ( $^3\text{H}$ - $\text{E}_2$ ) und von  $^3\text{H}$ -Tergurid ( $^3\text{H}$ -Te) in die Gebärmutter der geschlechtsunreifen Ratten wurde 16 Stunden lang nach der vorhergehenden Behandlung der Tiere mit mittelsynthetischem Mutterkornalkaloid Tergurid [Saueraleinat N-(D-6-Methyl-8-Isoergolin-I-yl) — N',N'-Harnstoffdiäthyl; VÚFB-6638] verfolgt. Die in der Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Te in Abhängigkeit von der Anwesenheit der ovariellen Steroide ( $\text{E}_2$  und Progesteron) beobachteten Unterschiede wurden während der gleichen Zeit auch bei erwachsenen ovariectomierten Ratten verfolgt. Die durchschnittlichen Aktivitätswerte von  $^3\text{H}$ - $\text{E}_2$  in der Gebärmutter der juvenilen Ratten, die mit Tergurid behandelt worden waren, lagen in allen verfolgten Zeitintervallen unter denjenigen der Kontrollgruppen. Diese Senkung war binnen 8 Stunden nach der Applikation statistisch bedeutend ( $P < 0.05$ ). Der Zeitverlauf der Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Te in der Gebärmutter der Versuchs- und Kontrolltiere war ähnlich. Die Aktivitäten des inkorporierten  $^3\text{H}$ -Te in der Gebärmutter der erwachsenen Ratten, die mit  $\text{E}_2$  behandelt worden waren, waren in allen verfolgten Zeitintervallen höher, statistisch bedeutend nach 2 und 16 Stunden ( $P < 0.05$ ) und nach 4 Stunden ( $P < 0.01$ ). Progesteron rief keine statistisch bedeutenden Unterschiede in der Inkorporation von  $^3\text{H}$ -Te hervor. Die angeführten Ergebnisse sprechen von einem direkten Einfluss von  $\text{E}_2$  auf die erhöhte Inkorporation von Tergurid in der Gebärmutter der erwachsenen Ratten. Versuche an juvenilen Ratten wiesen nach, dass Tergurid keinesfalls an oestrogene Rezeptoren gebunden wird. Die Gewichtssenkung der Gebärmutter der juvenilen mit Tergurid behandelten Ratten deutet auf die Unfähigkeit der Gebärmutterzellen hin auf das exogen verabreichte  $\text{E}_2$  zu reagieren. Bei erwachsenen ovariectomierten Ratten zeugt das erhöhte Gebärmuttergewicht nach Applikation von Tergurid von einer synergischen Wirkung von  $\text{E}_2$ .

Inkorporation; Östradiol; Progesteron

#### Adresa autorů:

MVDr. Jan Lidický, ing. Josef Pícha, CSc., MVDr. Jiřina Sedláková, MVDr. Drahomíra Píchová, CSc., Výzkumný ústav pro biofaktory a veterinární léčiva, Pohoří-Chotouň, 254 49 Jilové u Prahy

# SOUBORNÝ PŘEHLED

---

## LÉČENÍ ZVÁPENATĚNÍ VČELÍHO PLODU CHOLINOVOU SOLÍ N-GLUKOSYLPOLYFUNGINEM (ASCOCIDIN — POLFA)

Z. Gliński

---

GLIŃSKI, Z. (Laboraťor nemoci včel, Lublin, Polsko): *Léčení zvápnení včelího plodu cholinovou solí N-glukosylpolyfunginem (Ascocidin — Polfa)*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 442-448.

Z mnoha antimykotik, která byla dosud zkoušena, dává cholinová sůl N-glukosylpolyfunginu (polyenní antibiotikum typu Nystatinu; Ascocidin — Polfa) spolu s provozními metodami (odstranění plástů s nakaženým a uhynulým plodem, přeložení napadených včelstev na nové plásty) nové terapeutické možnosti, jak léčit zvápenatění včelího plodu. Ascocidin je účinnější než Nystatin a Amphotericin B. Je dobře rozpustný ve vodě, je fungicidní v koncentraci, jež plně zamezuje růst *Ascosphaera apis*, není jedovatý pro včely a jejich plod, je stabilní ve vodě i v cukerném sirupu, a proto je dobře použitelný při krmení. Nemá repelentní účinky a téměř nekontaminuje med, pokud se léčivo použije podle návodu. Rezistence na tento fungicid není známa. Ascocidinem (100 mg na 250 ml cukerného sirupu, postřikem na plod a na včely na plástech) lze zcela vymýtit nákazu i v silně napadených včelstvech, pokud je použit čtyřikrát v pětidenních intervalech. Nákaza se již neopakuje.

*Ascosphaera apis*; antimykotika; provozní metody; léčení

---

Parazitismus hub je v přírodě stejně rozšířený jako jejich symbióza. Je to schopnost mnoha hub žít v úzkém spojení s hmyzem. Při parazitismu houba škodí svému hostiteli. Příkladem příležitostného parazitismu a stresového onemocnění včel je nákaza včelího plodu vyvolaná houbou *Ascosphaera apis*, která často škodí včelstvům (Mehra aj., 1976; Herbert aj., 1977; Gilliamová aj., 1978; Gliński, 1981). Někteří autoři nepovažují zvápenatění včelího plodu za vážnou hrozbu pro včelařství, většina se však shoduje v názoru, že zvápenatění způsobuje vážné škody ve včelařství, zvláště v nepříznivých letech s deštivým počasím, se špatnou snůškou, ve znečištěném životním prostředí nebo ve spojení s jinými nemocemi včel (Thomas a Luce, 1972; Gilliamová, 1978).

Škodlivost zvápenatění včelího plodu a jeho šíření v posledních letech donutilo mnohé výzkumníky ke studiu vnitřních i vnějších činitelů, jež ovlivňují šíření nákazy, průběh onemocnění i odolnost včelího plodu (Mehra aj., 1976; Herbert aj., 1977; Gliński, 1981; Gil-

liamová aj., 1983). Proti nákaze bylo zkoumáno mnoho antibiotik a antiseptik (Giauffret a Taliercio, 1967; Hristea, 1973; Samšiňáková aj., 1978). Většina snah léčit zvápenatění chemickými přípravky však byla neúčinná.

Jako nejnadějnější léčiva proti zvápenatění včelího plodu se ukázala polyenová antibiotika Amphotericin B a Nystatin. Jejich toxicita pro včelí plod a malá účinnost však omezila jejich praktické použití (Gliński a Rzedzicki, 1980a, b; Gliński a Chmielewski, 1982). Nyastatin je navíc nerozpustný ve vodě i v cukerném sirupu a nemůže proniknout do tkání těla včelí larvy.

Nedávno byla objevena skupina antimykotických antibiotik — N-glukosylové deriváty polyfunginu, což je komplex čtyř polyenních antibiotik z tetraenní skupiny, produkovaných *Streptomyces noursei*, var. *polyfungini*, jež jak *in vitro*, tak *in vivo* tvoří rozpustné soli s pronikavým antimykotickým účinkem (Płóciennik aj., 1978). Polyenní antibiotika navíc zcela omezují růst houby *Ascosphaera apis*, proti uvedeným antibiotikům není dosud vytvořena rezistence, a proto nejsou překážky, proč by nemohla být použita při léčení zvápenatění včelího plodu. Biologické vlastnosti N-glukosylpolyfunginů naznačují, že cholinová sůl N-glukosylpolyfunginu (přípravek Ascocidin — Polfa) může být velmi zajímavým antimykotikem.

Máme-li léčit zvápenatění včelího plodu plošně antibiotiky a předpokládáme-li, že vztah mezi hostitelem a patogenem je infekční, musíme dodržet nejméně čtyři základní podmínky, aby použitá antibiotika byla účinná:

1. Nejdůležitějším předpokladem úspěšného léčení je volba vhodného přípravku rozpustného ve vodě, účinného proti klíčení a dalšímu množení houby *Ascosphaera apis*. Přípravek musí působit fungicidně, musí ničit parazita celkově, být účinným ve včelstvu, při skladování nesmí ztrácet účinnost, nesmí však být toxický pro včely a včelí plod, včely jej musí v potravě dobře přijímat.

2. Je nutné zničit spóry houby *Ascosphaera*, které jsou velmi odolné a přetrvávají v úlech mnoho let. Na plástech a v úlu zůstává mnoho miliónů spór z rozpadajících se nakažených larev, ulpívají i na nářadí, které potom je zdrojem další infekce. Včelař může snížit množství spór ve včelstvech použitím dezinfekčních prostředků nebo vhodnými manipulačními zásahy. To vše ovlivňuje působnost antibiotik. Vlastní chemoterapie může potlačit infekci, ale nákaza se zpravidla opakuje v příští včelařské sezóně, protože většina antibiotik je neúčinná na spóry v plástech, v pylu nebo na včelařském nářadí. Podaří-li se zničit všechny spóry, nákaza se nemůže opakovat.

3. Účinky antibiotik jsou ovlivněny vlastnostmi včelstva, jako jsou přirozená odolnost proti nákaze nebo zvýšený sklon k nákaze, vyvinutý čistící pud a další. Hygienické chování včelstva můžeme zlepšit některými chemickými přípravky nebo výměnou matky. Včelstva s dobrými hygienickými vlastnostmi pomáhají léčit zvápenatění tím, že ve zvýšené míře odstraňují napadený a uhynulý včelí plod a snad mohou odstraňovat i původce nákazy.

4. Med léčených včelstev musí být zdravotně nezávadný pro humánní spotřebu. Abychom předešli nebezpečí, že léčebné přípravky zůstanou v úle a dostanou se i do medu, používají se antibiotika, která

| Antimykotikum         | Minimální inhibiční koncentrace<br>poměrná hodnota |
|-----------------------|----------------------------------------------------|
| Ascocidin             | 1                                                  |
| Kyselina sorbová      | 5                                                  |
| Nystatin              | 7–10                                               |
| Amphotericin          | 20                                                 |
| Griseofulvin          | 20–40                                              |
| Thiobendazol          | 50                                                 |
| Kyselina undecylenová | 50                                                 |

se rychle rozkládají a nejsou v medu škodlivá pro konzumenty, nebo musíme včelstva léčit před hlavní snůškou a před lečením všech med vymetat.

Na uvedených zásadách byla vypracována metoda léčení zvápenatění včelího plodu Ascocidinem. Růst *A. apis* byl v pokusech *in vitro* inhibován v koncentraci 5,0 až 13,0 m. j. Ascocidinu na 1 ml média SDA-YA (pH 6,8) při teplotě 30 °C (Gliński a Rzedzicki, 1980a).

V pokusech bylo dále stanoveno, že Ascocidin je jak *in vitro*, tak *in vivo* mnohem účinnější než ostatní antimykotika (Gliński a Rzedzicki, 1980a, b, c). V tab. I jsou pro srovnání uvedeny poměrné hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC).

Koncentrace Ascocidinu, která působí fungicidně, se příliš neliší od koncentrace působící zastavení růstu. Minimální fungicidní koncentrace (MFC) Ascocidinu je 5,0 až 18,5 m. j. na ml. Stojí za zmínku, že po sedmi letech výzkumu nebyl nalezen žádný kmen *A. apis* rezistentní na Ascocidin. Ascocidin inhibuje růst další houby patogenní pro včely — *Aspergillus* sp. a houby *Beetsia alvei*, která znehodnocuje pylové zásoby (MIC 5,8–12,2 m. j. na ml a 5,0 m. j. na ml). Účinná koncentrace Ascocidinu *in vivo* je dokonce desetkrát nižší než *in vitro*. Vysvětlujeme si to akumulací antibiotika v napadených larvách a také tím, že Ascocidin účinkuje fungicidně a ničí původce nákazy.

V laboratorních pokusech byla zjišťována toxicita Ascocidinu pro dvoudenní až pětidenní včelí larvy a dospělé včely. Ukázalo se, že Ascocidin není toxický po jednorázové orální aplikaci (LD<sub>50</sub> je 592 m. j. na larvu a 388,5 m. j. na včelu) ani po 24 hodinách krmení (LD<sub>50</sub> je 832,5 m. j. na larvu a 703 m. j. na včelu). Včely a včelí plod byly krmeny potravou s obsahem 4625 m. j. na ml po dobu 24 hodin, aniž by se později na nich projevovaly jakékoliv známky toxikózy.

Koncentrace Ascocidinu v potravě převýšila 333 × hodnotu MIC, přičemž účinná koncentrace přípravku je 700 až 1054 × nižší než jeho toxická koncentrace. Proto denní dávka přípravku — 100 mg (185 000 m. j.) na 250 ml cukerného sirupu — doporučená proti zvápenatění, je zcela bezpečná a nemá vliv na plodování včelstev (Gliński, 1979; Osipowski, 1984).

Při používání léčiv ve včelstvech musíme dbát o to, aby byl zajištěn dobrý terapeutický výsledek a současně aby byla vyloučena kontaminace medu. Pokud nemůžeme kontaminaci medu zabránit, je nutné použít léčivo, které se rychle rozkládá. Ascocidin ztrácí účinnost brzy, již po 7 až 13 dnech při teplotě 18 až 34 °C klesá jeho aktivita v cukerném sirupu i v medu o 50 %. To umožňuje, aby byl použit v týdenních intervalech a třeba i během hlavní snůšky. Ve skladovaném medu nezůstávají stopy po antibiotiku bez ohledu na to, jak bylo použito a jak dlouho léčení včelstev trvalo. Přesto však se doporučuje použít Ascocidin v cukerném sirupu až po vymetání medu, protože je zcela rozložen v zásobách až po 30 dnech (Gliński a Rzedzicki, 1980c; Gliński a Chmielewski, 1981). Předností Ascocidinu je, že terapeutickou dávku v 10 až 50% cukerném sirupu včely dobře odebírají, což nasvědčuje tomu, že Ascocidin nemá repelentní účinky, nemá vliv na dávkování ani na dobu krmených pokusů (Gliński, v tisku). Biochemické pochody a změny léčiva v hmyzím těle dosud nejsou prostudovány.

Účinek léčení však může být dost rozdílný a záleží na tom, jak intenzívně je rozšířeno zvápenatění, jak silné je napadené včelstvo, jakou dávku léčiva použijeme, jak léčivo podáváme (Osipowski, 1984). V našich pokusech s intenzívní léčbou jsme zjistili, že nákaza může být zcela vymýcena i v silně napadených včelstvech, aniž by se opakovala. Čtyři dávky Ascocidinu v množství 100 mg na 250 ml cukerného sirupu (1:1), kterými byl postříkán včelí plod a včely na plástech, včelstvo vyléčily. V prvních 24 hodinách vyházel ošetřená včelstva všechen nezavíčkovaný uhynulý plod, později odvíčkovala a vyklidila buňky s mrtvým plodem. První léčení snížilo napadení a byly odstraněny mumie nakažených larev, později se nakažený plod ve včelstvech vůbec nevyskytl. Mykologické vyšetření včelích larev a dospělých včel po dvou týdnech od ukončení terapie bylo negativní. To znamená, že léčení bylo účinné.

V obdobných pokusech, při nichž byla včelstva krmena medikovaným sirupem (400 mg Ascocidinu na 0,5 l) čtyřikrát po čtyřech dnech, byla nákaza ve všech napadených včelstvech zcela likvidována. Přesto však se opakovala v příští sezóně u 10 % včelstev. Pokud jsou včelstva krmena léčivým sirupem a mají málo zásob, přijímají sirup rychleji a účinek léčení je lepší.

U silně napadených slabších včelstev byly pozorovány rozdílné výsledky. Léčení sice nápadně snížilo nákazu (až o 10 %) u včelstev, u kterých byl Ascocidin v sirupu stříkán na pláсты s plodem, a až na 6 % u včelstev, která byla krmena léčivým cukernatým sirupem. Pokud se zvápenatění neobjevilo znovu, včelstva nebyla více léčena. V příští sezóně se nákaza opakovala téměř u 10 % včelstev, která po prvním léčení byla zdánlivě vyléčena. Svědčí to o tom, že Ascocidin nezahubil všechny spóry houby *Ascosphaera apis*. Aby ochrana proti naze zvápenatěním byla co nejdokonalejší a předešlo se opakování nákazy, doporučujeme vyloučit možné zdroje infekce úpravou včelstev (smést včely z plástů napadeného včelstva a přeložit včelstvo do čistého dezinfikovaného úlu, odstranit pláсты s napadeným plodem ještě před léčením atd.). Pláсты a nářadí musí být sterilizovány. Včelstvo se musí přeložit ve vhodnou dobu, aby vystavělo nové dílo, stačilo si vytvořit dostatek zásob apod.

Úplnou likvidaci nákazy v silně napadených včelstvech a zamezení toho, aby se infekce v příštích dvou letech opakovala, jsme zjistili po postřiku plástů s plodem Ascocidinem v dávce 100 mg na 250 ml cukerného sirupu. Stríkáno bylo čtyřikrát v pětidenních intervalech. Při základním ošetření byly odstraněny plásty s nakaženým plodem.

Jen zřídka se stalo (0,8 %), že se nakažená včelstva, krmená po odstranění napadeného plodu čtyřikrát po čtyřech dnech Ascocidinem v cukerném sirupu (400 mg na 0,5 l sirupu), neuzdravila. Nákaza se obnovila u 1,2 % včelstev po jednom až dvou měsících, u 2,8 % včelstev ještě v příštím roce. Po dalším léčení těchto včelstev Ascocidinem (100 mg na 0,25 l sirupu, krmeno dvakrát až čtyřikrát v pětidenních intervalech) se včelstva úplně uzdravila.

Zkoušeli jsme i jiné způsoby léčení včelstev Ascocidinem: poprášení práškovitým léčivem, krmení malými dávkami léčiva v krátkých intervalech. Ani jeden způsob však nebyl lepší než postřik plástů a včel Ascocidinem v sirupu. Léčení je hospodárné, je-li nákaza hodně rozšířena. Po jedné až dvou sezónách léčení je nutné jednu sezónu vynechat, aby se zjistilo, zda je vůbec nutné v léčení pokračovat.

V současnosti je velký zájem o nové metody sterilizace plástů a nářadí, protože nákaza se šíří jak plásty, tak nářadím. Spóry *Ascosphaera apis* jsou velmi odolné vůči nepříznivým vlivům a v patogenním materiálu mohou přetrvávat dlouhou dobu. Mohou však přežívat i mimo tělo hostitelovo. Použitím evaporační a imerzní metody pro stanovení fungicidního účinku přípravku a studiem účinku různých dezinfekčních přípravků na včelnicích bylo prokázáno, že nejúčinnějšími dezinfekčními prostředky jsou formalin, ledová kyselina octová a tymol (Gliński aj., 1981a, b). Páry formaldehydu a ledové kyseliny octové jsou nejvhodnější pro dezinfekci plástů a nářadí, protože rozrušují jak vegetativní formy, tak spóry houby *Ascosphaera apis* již po čtyřech týdnech.

Nejúčinnějším dezinfekčním prostředkem úlů u včelstev se zvápenatělým plodem je 3% vodný roztok formalínu nebo 2% tymolová vodní suspenze, jež působí nejméně 20 minut. Po sterilizaci těmito látkami se úly musí dvakrát opláchnout vodou.

Jaké jsou perspektivy léčení zvápenatění včelího plodu? Objevení nových účinnějších fungicidů, výběr linií včel rezistentních vůči zvápenatění, výběr včelstev se zvýšenou čistící schopností, změny ve včelařském provozu, jež by omezily přenos nákazy, vyloučení chovu slabých včelstev a všech ostatních stresových činitelů — to vše zvýší předpoklady pro dokonalejší léčbu zvápenatění včelího plodu chemickými přípravky.

## Literatura

- GIAUFFRET, A. — TALIERCIO, Y. P.: Les mycoses de l'abeille (*Apis mellifica* L.): Étude de quelques antimycosiques. Bull. Apic., 10, 1967, s. 163-174.  
GILLIAM, M.: Chalkbrood — Status today and hopes for control. Amer. Bee J., 118, 1978, s. 486-471.  
GILLIAM, M. — TABER, S. — BRAY ROSE, J.: Chalkbrood disease of honey bees, *Apis mellifera* L.: A progress report. Apidologie 9, 1978, s. 75-89.  
GILLIAM, M. — TABER, S. — RICHARDSON, G. V.: Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. Apidologie, 14, 1983, s. 29-39.  
GLIŃSKI, Z.: Laboratornyje i praktičeskije issledowanja po terapii izwiestnogo razploda pri pomoszczu polienowych antibiotikov. Apiacta, 14, 1979, s. 176.

- GLIŃSKI, Z.: Studies on the effect of the fungus *Ascosphaera apis* on larvae of the honey bee, *Apis mellifera* L. Pol. Arch. weter., 23, 1981, s. 9-16.
- GLIŃSKI, Z.: Honey bee responses to sucrose solutions of various concentrations of sugar and choline salt of N-glucosylpolifungine. Pol. Arch. weter. V tisku.
- GLIŃSKI, Z. — CHMIELEWSKI, M.: Badania nad wykrywaniem pozostałości soli cholinowej N-glukozylopolifunginy w miodach. Med. weter., 37, 1981, s. 732-736.
- GLIŃSKI, Z. — CHMIELEWSKI, M.: Antifungal activity of certain polyene antibiotics against *Ascosphaera apis*, the causative agent of chalkbrood. Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sect. DD, 34, 1979 (1982), s. 1-7.
- GLIŃSKI, Z. — KOWALSKA, M. — OSIPOWSKI, T.: Aktywność wybranych środków dezynfekcyjnych w stosunku do *Ascosphaera apis*. Wed. weter., 37, 1981a, s. 277-301.
- GLIŃSKI, Z. — KOWALSKA, M. — OSIPOWSKI, T. — CHMIELEWSKI, M.: Ocena skuteczności wybranych środków odkażających w grzybicy otorbielakowej czerwia pszczoły miodnej. Nowości Weter., 11, 1981b, s. 76-83.
- GLIŃSKI, Z. — RZEDZICKI, J.: Chalk brood disease of the honey bee (*Apis mellifera* L.). The *in vitro* studies on some antimycotics with particular reference to polyene antibiotics. Pol. Arch. Weter., 22, 1980a, s. 315-322.
- GLIŃSKI, Z. — RZEDZICKI, J.: Chalk brood disease of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Toxicity of the polyfungine antibiotics and Amphotericin B to larval and adult honey bees. Pol. Arch. Weter., 22, 1980b, s. 297-303.
- GLIŃSKI, Z. — RZEDZICKI, J.: Chalk brood disease of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Stability of the polyfungine antibiotics and Amphotericin B in honey and sugar syrup. Pol. Arch. Weter., 22, 1980c, s. 305-313.
- HERBERT, E. W. — SHIMANUKI, H. — KNOX, D. A.: Transmission of chalk brood disease of honeybees by infected queens and worker brood and adults. J. apicult. Res., 16, 1977, s. 204-208.
- HRISTEA, C. L.: Combaterea puietului varos. Apicultură, 26, 1973, s. 24-29.
- MEHR, Z. — MENAPACE, D. M. — WILSON, W. T. — SACKETT, R. R.: Studies on the initiation and spread of chalkbrood within an apiary. Amer. Bee J., 116, 1976, s. 266-268.
- OSIPOWSKI, T.: Badania nad wpływem zabiegów hodowlano-sanitarnych na wyniki leczenia grzybicy otorbielakowej czerwia pszczoły miodnej sola cholinowa N-glukozylopolifunginy. [Diss. doct.] Lublin 1984.
- PŁÓCIENNIK, Z. — KOWSZYK-GINDIFER, Z. — HORODECKA, M. — LEWCZUK-MRÓZEK, Z. — BOJARSKA-DAHLING, H.: Synthesis and characteristics of N-methylglucamine salts of N-glucosylpolifungin, N-glucosylmystatin and N-glucosylamphotericin B, the water soluble derivatives of antifungal polyene antibiotics. Acta Pol. pharm., 35, 1978, s. 125-131.
- SAMSIŇÁKOVÁ, A. — KÁLALOVÁ, S. — HARAGSIM, O.: Effects of some antimycotics and disinfectants on the *Ascosphaera apis* Maasen fungus *in vitro*. Z. angew. Ent., 84, 1977, s. 232-241.
- THOMAS, G. M. — LUCE, A.: An epizootic of chalkbrood, *Ascosphaera apis* (Maasen and Claussen) Olive and Spiltoir in the honey bee, *Apis mellifera* in California. Amer. Bee J., 112, 1972, s. 88-90.

Došlo dne 28. 10. 1985

ГЛИНСКИ, З. (Лаборатория болезней пчел, Люблин, Польша): **Лечение известкового расплода с помощью холиновой соли N-глюкосилполифунгина (Ascocidin — Polfa).** Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 442-448.

Из множества антимикотических средств, испытанных до сих пор, новые возможности лечения известкового расплода дают холиновая соль N-глюкосилполифунгина (полиэновый антибиотик типа Нистатина; Ascocidin — Polfa) наряду с механическими методами: удаление сотов с пораженным и погибшим расплодом, пересадка пораженных пчел на новые соты. Аскоцидин действеннее Нистатина и Амфотерицина Б. Он хорошо растворяется в воде, фунгициден в концентрации, полностью ограничивающей рост *Ascosphaera apis* не ядовит для пчел и расплода, устойчив в воде и сахарном сиропе, ввиду чего хорошо годится для кормления. Аскоцидин не оказывает отталкивающего действия и почти не контаминирует мед, если им пользоваться по указаниям. Устойчивость к нему пока не известна. Аскоцидином в количестве 100 мг на 250 мл сах. сиропа, опрыскивая расплод и пчел на сотах, можно полностью подавить заражение

даже в сильно пораженных пчелосемьях, если их обрабатывать 4 раза в 5-дневные интервалы. Заражение не повторяется.

*Ascosphaera apis*; антимикотические средства; методы применения; терапия

GLIŃSKI, Z. (Bee Disease Research Laboratory, Lublin, Poland): *Control of Chalkbrood Disease by Choline Salt of N-glucosylpolyfungine (Ascocidin — Polfa)*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 442-448.

Out of many antimycotics so far studied, choline salt of N-glucosylpolyfungine (polyene antibiotic of Nystatin typ; Ascocidin — Polfa) used together with manipulative treatments (removal of combs with sick and dead brood or shaking bees from disease colonies onto new combs) opens new therapeutical possibilities in the control of chalkbrood disease. Ascocidin is more effective than Nystatin and Amphotericin B. It is water-soluble of a good bioavailability, fungicidal at a concentration which inhibits the growth of *A. apis* completely, virtually non-toxic for brood and bees, stable in water and sucrose syrup and therefore satisfactory for administration. Moreover, Ascocidin is devoid of repellent activity, practically it does not contaminate trade honey when used according to recommendations and the resistance to this antibiotic is not known. A complete elimination of chalkbrood disease and lack of recurrency, even in severely infected colonies, is obtained when Ascocidin (100 mg/250 ml of sucrose syrup; spraying on brood and bees on combs) is used four times at five-day intervals after manipulative treatments.

*Ascosphaera apis*; chalkbrood; choline salt of N-glucosylpolyfungine; Ascocidin; therapy

GLIŃSKI, Z. (Labor für Bienenkrankheiten, Lublin, Polen): *Behandlung der Verkalkung der Bienenbrut mit Cholinsalz N-Glukosylpolyfungin (Ascocidin — Polfa)*. Veter. Med. (Praha), 31, 1986 (7) : 442-448.

Unter den zahlreichen Antimykotika, die bisher erprobt wurden, erschließt das Cholinsalz N-Glukosylpolyfungin (polygenes Antibiotikum vom Typ Nystatin; Ascocidin — Polfa) in Verbindung mit Betriebsvorkehrung (Beseitigung von Waben mit angesteckter oder eingegangener Brut, umlegen befallener Völker auf neue Waben) neue therapeutische Möglichkeiten der Behandlung von Verkalkung der Bienenbrut. Das Ascocidin erwies sich als wirksamer als das Nystatin und das Amphotericin B. Es ist gut löslich im Wasser, wirkt fungizid in einer Konzentration, die das Wachstum der *Ascosphaera apis* völlig unterbindet, ohne für Bienen und ihre Brut giftig zu sein. Es ist sowohl im Wasser als auch im Zuckersirup stabil und daher beim Füttern gut anwendbar. Es hat keine Repellentwirkung und der Honig wird fast gar nicht kontaminiert, falls das Medikament anleitungsgemäß angewandt wird. Gegenüber diesem Fungizid ist keine Resistenz bekannt. Durch Besprühung von Brut und Bienen auf Waben mit Ascocidin (100 mg pro 250 ml Zuckersirup) kann sie Seuche auch in stark befallenen Völkern völlig behoben werden, falls das Präparat viermal in fünftägigen Intervallen angewandt wird. Rückfälle der Ansteckung treten nicht auf.

*Ascosphaera apis*; Antimykotika; Betriebsvorkehrungen; Behandlung

---

Adresa autora:

Prof. dr. Zdzisław Gliński, Akademia rolnicza, Akademicka 12, 20 934 Lublin, Polsko

---

## OBSAH

|                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Hofírek B., Granátová M., Hořín P., Mádr V., Pleva V.: Imunoenzymatický průkaz viru enzootické leukózy skotu (BLV) v buněčných kulturách . . . . . | 385 |
| Baran V., Petřík P., Federič F., Škarda R., Lenhardt L.: Intramammálně tělesko v boji proti infekčním mastitidám kráv . . . . .                    | 393 |
| Dvořák M.: Změny koncentrace bílkovin krevního séra selat v průběhu vývoje a při stresu . . . . .                                                  | 403 |
| Machatková M., Jurmanová K., Šnejdar V.: Dekontaminace kontinuálních buněčných linií spontánně infikovaných mykoplazmaty . . . . .                 | 415 |
| Kredl F., Křen K.: Rezidua chlорованých pesticidů a polychlорованých bifenylov ve vejcích a tukových tkáních volně žijících ptáků . . . . .        | 423 |
| Lidický J., Pícha J., Sedláková J., Píchová D.: Vliv ovariálních steroidů na farmakokinetiku Terguridu v děloze krys . . . . .                     | 433 |
| Souborný přehled                                                                                                                                   |     |
| Gliński Z.: Léčení zvápenatění včelího plodu cholinovou solí N-glukosylpolyfunginem (Ascocidin — Polfa) . . . . .                                  | 442 |

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Гофирек Б., Гранатова М., Горжин П., Мадр В., Плева В.: Иммуноэнзиматическое доказательство вируса энзоотического лейкоза скота (BLV) в клеточных культурах . . . . . | 385 |
| Баран В., Петрик П., Федерич Ф., Шкарда Р., — Ленард Л.: Интрамаммарное тельце в борьбе с инфекционным маститом . . . . .                                             | 393 |
| Дворжак М.: Изменения концентрации белков в сыворотке крови поросят в течение их развития и в условиях стресса . . . . .                                              | 403 |
| Махаткова М., Юрманова К., Шнейдар В.: Обеззараживание непрерывных клеточных линий, самопроизвольно зараженных микоплазмами . . . . .                                 | 415 |
| Кредл Ф., Кржен К.: Последствия хлорированных пестицидов и полихлорированных бифенилов в яйцах и жировых тканях птиц, живущих на воле . . . . .                       | 423 |
| Лидицки Я., Пиха Й., Седлакова Й., Пихова Д.: Влияние овариальных стероидов на фармакокинетику Тергурида в матке крыс . . . . .                                       | 433 |
| Глински З.: Лечение известкового расплода с помощью холиновой соли N-глюкосилполифунгина (Ascocidin — Polfa) . . . . .                                                | 442 |

## CONTENTS

|                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Hofírek B., Granátová M., Hořín P., Mádr V., Pleva V.: Immunoenzymic Detection of Enzootic Bovine Leukosis Virus (BLV) in Cell Cultures . . . . .  | 385 |
| Baran V., Petřík P., Federič F., Škarda R., Lenhardt L.: An Intramammary Device to Combat Infectious Mastitis in Cows . . . . .                    | 393 |
| Dvořák M.: Changes in the Protein Concentration of the Blood Serum of Piglets during Ontogenesis and in Stress Situations . . . . .                | 403 |
| Machatková M., Jurmanová K., Šnejdar V.: Decontamination of the Continual Cell Lines Spontaneously Infected with Mycoplasmas . . . . .             | 415 |
| Kredl F., Křen K.: Residues of Chlorinated Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in the Eggs and Fatty Tissues of Wild Birds . . . . .          | 423 |
| Lidický J., Pícha J., Sedláková J., Píchová D.: The Effect of Ovarial Steroids on the Pharmacokinetics of Tergurid in the Uterus of Rats . . . . . | 433 |
| Gliński Z.: Control of Chalkbrood Disease by Choline Salt of N-glucosylpolyfungine (Ascocidin — Polfa) . . . . .                                   | 442 |

## INHATL

|                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Hofírek B., Granátová M., Hořín P., Mádr V., Pleva V.:<br>Immunoenzymatischer Nachweis des Virus der enzootischen Rinderleukose<br>(BLV) in Zellkulturen . . . . . | 385 |
| Baran V., Petřík P., Federič F., Škarda R., Lenhardt E.:<br>Intramammares Körperchen im Kampf gegen infektiöse Mastitiden bei Kühen<br>. . . . .                   | 393 |
| Dvořák M.: Veränderungen der Konzentration der Blutserumeiweißstoffe<br>von Ferkeln im Verlauf ihrer Entwicklung und bei Streß . . . . .                           | 403 |
| Machatková M., Jurmanová K., Šnejdar V.: Dekontaminierung<br>von durch Mykoplasmen spontan infizierten kontinuierlichen Zelllinien . . . . .                       | 415 |
| Kredl F., Křen K.: Residuen von chlorierten Pestiziden und polychlo-<br>rierten Biphenylen in Eiern und Fettgeweben der wildlebenden Vögel . . . . .               | 423 |
| Lidický J., Pícha J., Sedláková J., Píchová D.: Einfluss der<br>ovarialen Steroide auf die Pharmakokinetik von Tergurid in der Gebärmutter<br>der Ratten . . . . . | 433 |
| Gliński Z.: Behandlung der Verkalkung der Bienenbrut mit Cholisalz<br>N-Glukosylpolyfungin (Ascocidin — Polfa) . . . . .                                           | 442 |

Rukopisy odevzdány k tisku 2. 4. 1986 — Podepsáno k tisku 29. 5. 1986

---

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.