

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

0

39 (LXVII)
1994
0375-8427

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
SLOVENSKÁ AKADÉMIA PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

The journal publishes experimental papers and reviews from all spheres of veterinary medicine

The contents of all editions and paper summaries are covered by Current Contents-Agriculture, Biology and Environmental Sciences

Editorial Board – Redakční rada

Prof. MVDr. Jan B o u d a , DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Ivan H e r z i g , CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumír H o f í r e k , DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Karel H r u š k a , CSc. (Chairman), Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Gabriel K o v á č , DrSc., University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Doc. MVDr. Imrich M a r a č e k , DrSc., Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Doc. MVDr. Ivan R o s i v a l , CSc., University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Prof. MVDr. Bohumil Š e v č í k , DrSc., Research Institute of Feed Supplements and Veterinary Drugs, Jílové u Prahy, Czech Republic

Editor in Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdenka Radošová

OLIGONUCLEOTIDE (GTG)₅ IN BACTERIAL DNA FINGERPRINTING

I. Rychlík, L. Bejčková

Veterinary Research Institute, Brno

On a set of 198 bacterial strains out of 19 different species we have tested the ability of oligonucleotide (GTG)₅ to provide definitive DNA fingerprints. All the tested bacteria gave rise to at least one band after digestion with Hinf I and hybridization with radioabelled oligonucleotide (GTG)₅. The number of resulting bands varied considerably from species to species and correlated strongly with the GC content of individual bacterial species. A set of 13 well defined laboratory strains of *Escherichia coli* was divided into 3 groups after GTG fingerprinting, while standard ribotyping revealed no differences. GTG fingerprinting is simple and reliable method for typing bacteria and may be of particular value in those bacterial species, where no other typing systems are available.

DNA fingerprinting; oligonucleotide probe; (GTG)₅; ribotyping

DNA fingerprinting is a useful method for comparing different organisms (Gill et al., 1985; Blumberg et al., 1992; Vosman et al., 1992). The method is now being used widely. In eucaryotes it is used for precise identification of individuals (Sullivan et al., 1993) and for parentage analysis in wild populations (Lang et al., 1993; Lubjuhn et al., 1993). In procaryotes it has been successfully used for identification of individual bacterial clones (Martineti and Altwegg, 1990; Doll et al., 1993) and in epidemiological studies (Blumberg et al., 1992; Chowdry et al., 1993).

Nucleic acids from the organisms under study are purified, digested with restriction endonucleases, the resulting fragments separated by electrophoresis, blotted to the inert membrane and are hybridized with a suitable probe (Eppelen, 1992; McCabe, 1992). The most critical parameters of this method are the choice of restriction endonuclease and suitable probe. Probes are usually directed against sequences which are multicopy and are randomly distributed throughout the genome. Different approaches have evolved (Crawford et al., 1991; Meyer et al., 1991; Miteva et al., 1992; Nath et al.,

1992; Stanley et al., 1992c; Chowdry et al., 1993) basically on two general approaches:

- relatively well defined cloned DNA fragments such as probes 33.15 and 33.6 used especially for fingerprinting in humans (Jeffreys et al., 1985a, b, c) and/or cloned rRNA genes (rDNA) for fingerprinting (ribotyping) in bacteria (Martinetti and Altwegg, 1990; Nastasi et al., 1991; Preheim et al., 1991; De Muro et al., 1992; Stanley et al., 1992d)
- randomly chosen oligonucleotides based on the sequences of the minisatellite regions, such as oligonucleotide (GTG)₅ (Zischler et al., 1989; Meyer et al., 1991; Vosman et al., 1992).

Until recently, the latter system has been used only for fingerprinting of eucaryotic organisms. It was reported recently that it can be used also for fingerprinting in *Salmonella* and *Shigella* (Doll et al., 1993). In this study, the authors investigated the use of the oligonucleotide (GTG)₅ in DNA fingerprinting of selected serotypes of *Salmonella* and *Shigella* and it was shown that especially in *Shigella* it could be of a particular value. Therefore, after our initial studies in *Mycobacterium paratuberculosis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Rychlík et al., 1994), we decided to test the ability of the oligonucleotide probe (GTG)₅ to provide suitable fingerprints on a wider range of different bacterial species. On a well defined set of laboratory strains of *Escherichia coli* we have then tested the discriminatory power of fingerprinting with the oligonucleotide (GTG)₅. These results were compared with the result of fingerprinting using an oligonucleotide probe complementary to the conservative region of rDNA i.e. to ribotyping.

MATERIAL AND METHODS

BACTERIAL STRAINS

The strains used in study are listed in Tab. I. In a total, 198 strains belonging to 19 bacterial species were fingerprinted with oligonucleotide (GTG)₅. The following strains of *E. coli* were used to determine the discriminatory power of GTG fingerprinting: DH5 α , HB101, TG1, TB1, XL1 Blue, SURETM, JM101, JM103, JM109, C600, LE392, BNN93 and Y1088.

DNA TECHNIQUES

Bacteria from approximately 1 cm² of a nutrient agar grown cultures were harvested, immobilized in 250 μ l 0.8% low-melting agarose, treated in lysozyme solution 1 mg/ml (including lysostaphin in the case of staphylococci) for 60 min at 37 °C and were then lysed for 48 hours at 50 °C in 0.5% SDS, 0.5 mg/ml proteinase K and 250 mM EDTA (Yan et al., 1991). After thorough washing

I. List of strains used in study

	Origin	No. of strains	Average GC content*	Average No. of GTG bands
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	VRI	24	42	19
<i>Bacillus cereus</i>	CCM	1	35	1
<i>Bacillus subtilis</i>	CCM	1	43	3
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	VRI	1	69	36
<i>Escherichia coli</i>	VRI	13	50	16
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCM	1	53	22
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCM	1	57	33
<i>Lactobacillus</i> sp.	VRI	1	44	13
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCM	1	37	15
<i>Micrococcus luteus</i>	CCM	1	73	23
<i>Mycobacterium avium</i>	VRI	7	65	25
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	VRI	66	65	25
<i>Pasteurella multocida</i>	VRI	1	42	15
<i>Proteus vulgaris</i>	CCM, VRI	2	39	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM	1	67	25
<i>Salmonella</i> sp.	CCM, VRI	73	51	16
<i>Sarcina ventriculi</i>	FaSc	1	31	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM	1	34	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCM	1	33	1

Abbreviations:

CCM – Czechoslovak Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic

VRI – strains isolated and characterized at Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

FaSc – strain provided by Dr. Bartos from Faculty of Science Masaryk's University, Brno, Czech Republic

* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986, Williams & Wilkins, Baltimore, USA

in TE (10mM TRIS HCl pH 7.5, 1 mM EDTA), the DNA in the agarose blocks was digested with the restriction endonuclease (Hinf I, Hind III, Amersham). Following digestion, samples were heated for 5 min to 65 °C, extracted with phenol and loaded onto 0.9% agarose gel. Electrophoresis was carried out at 40V (2 V/cm) for 15 hours. DNA was stained with ethidium bromide and viewed and photographed through an orange filter on UV transilluminator (S a m b r o o k et al., 1989). Restriction fragments were vacuum blotted onto a nylon membrane

(Hybond N, Amersham) and prehybridized and hybridized at 43 °C in Amersham's hybridization buffer according to the instruction of the manufacturer. Posthybridization washes were carried out 2 x 5 min in 5 x SSC, 0.1% SDS at room temperature, 2 x 20 min in 1 x SSC, 0.1% SDS at 43 °C following by brief wash in 1 x SSC at room temperature. Exposure times were usually from 1 to 7 days.

OLIGONUCLEOTIDES USED IN STUDY

Oligonucleotide probes were labelled on 3' ends using terminal transferase and $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP. The sequences of the oligonucleotide probes used in the study were as follows:

(GTG)₅: 5' GTG GTG GTG GTG GTG 3'

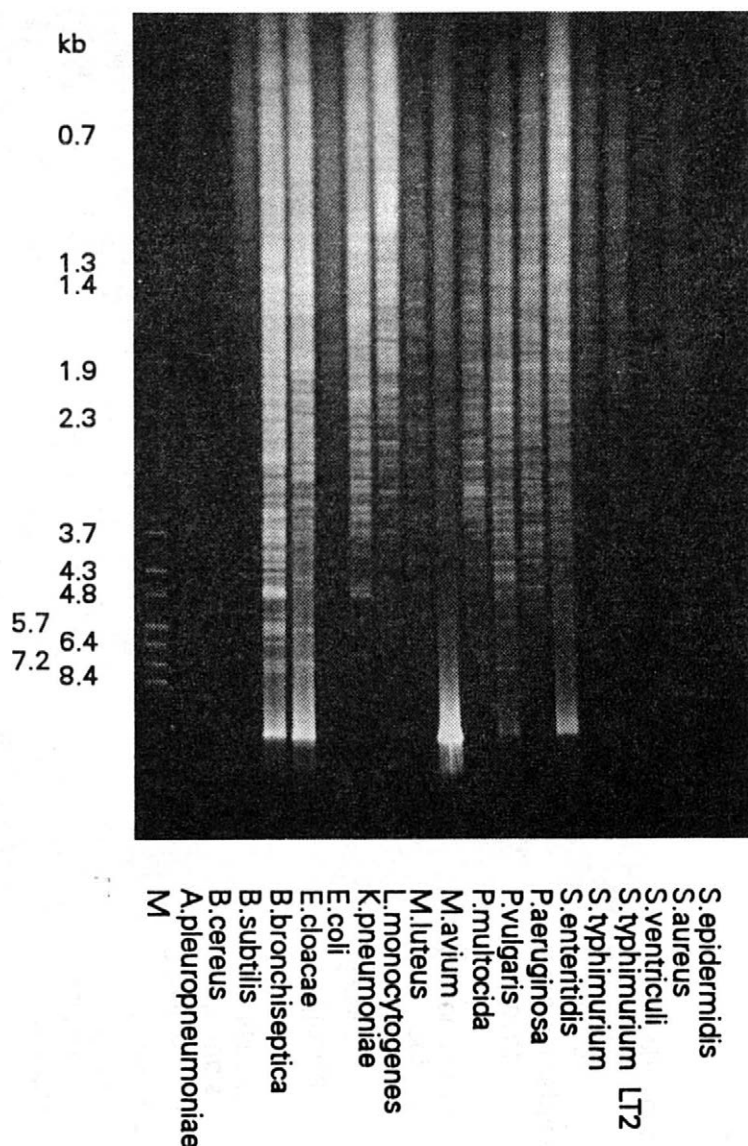
oligoriboprobe: 5' CAG GAT TAG ATA CCC TGG TA 3'

The sequence of oligoriboprobe (oligonucleotide probe complementary to the conservative region of rRNA genes) was chosen according to sequences published previously (Weisburg et al., 1991).

RESULTS AND DISCUSSION

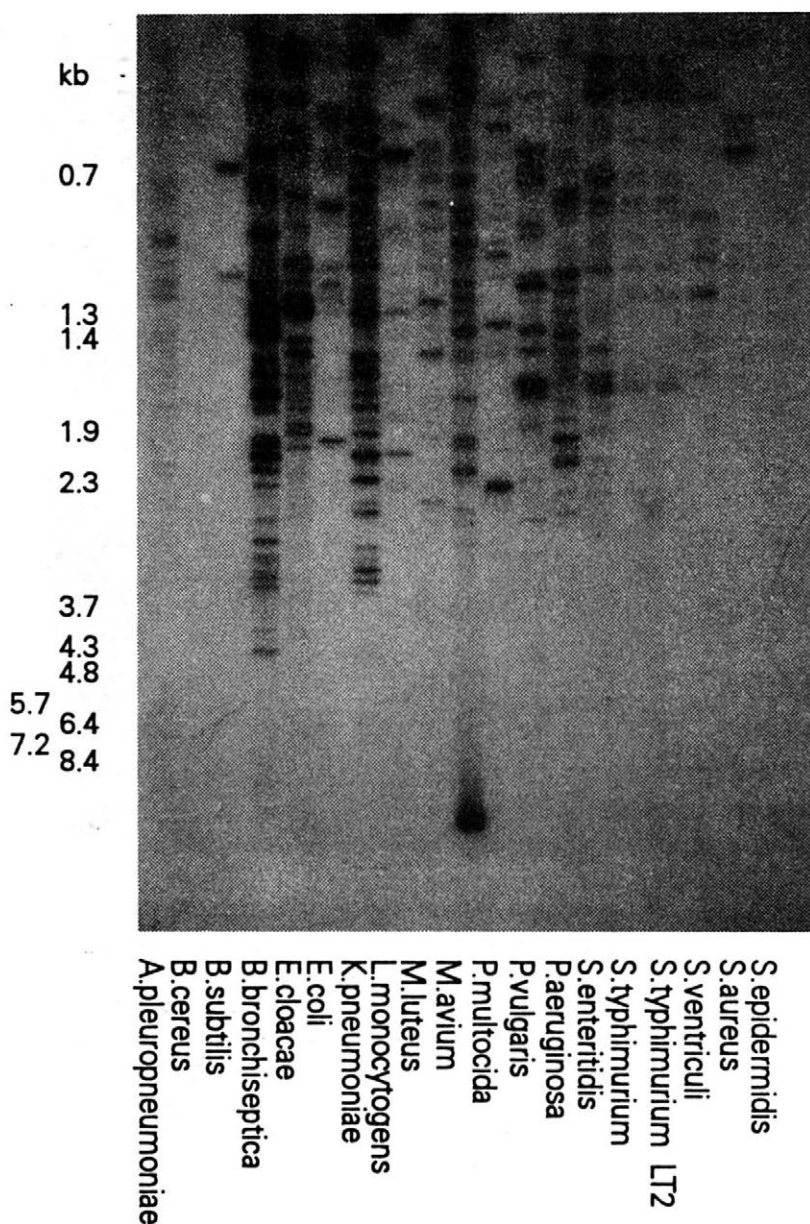
The aim of the study was to investigate the potential value of oligonucleotide (GTG)₅ for fingerprinting in bacteria. This oligonucleotide has been used so far, of one exception (Doll et al., 1993), for fingerprinting of eucaryotic organisms (Zischler et al., 1989; Kunstman et al., 1992; Vosman et al., 1992). However, we produced reasonable fingerprints when working with *Salmonella* sp., *M. paratuberculosis* (unpublished results) and *A. pleuropneumoniae* (Rychlík et al., 1994). Further we tested the ability of (GTG)₅ to work successfully in other bacteria. The results from GTG fingerprinting were compared to standard ribotyping with an oligonucleotide probe complementary to the conservative region of rDNA.

DNA of 198 strains of 19 different bacterial species was purified from the cells immobilized in low-melting point agarose and digested with restriction endonuclease Hinf I. Typical results are shown in Fig. 1. Only in the cases of *Bordetella bronchiseptica*, *Enterobacter cloacae*, *Mycobacterium avium*, *Proteus vulgaris* and *Salmonella enteritidis* there were traces of undigested DNA which can be, however, readily distinguished. After hybridization with the (GTG)₅ probe different number of hybridizing fragments appeared, which varied from species to species (Fig. 2). In all the species so far tested we found at least one fragment which reacted with the (GTG)₅ probe. Correlation between the GC content and number of fragments after hybridization was observed. The higher the GC content, the greater was the number of resulting fragments (Tab. I).

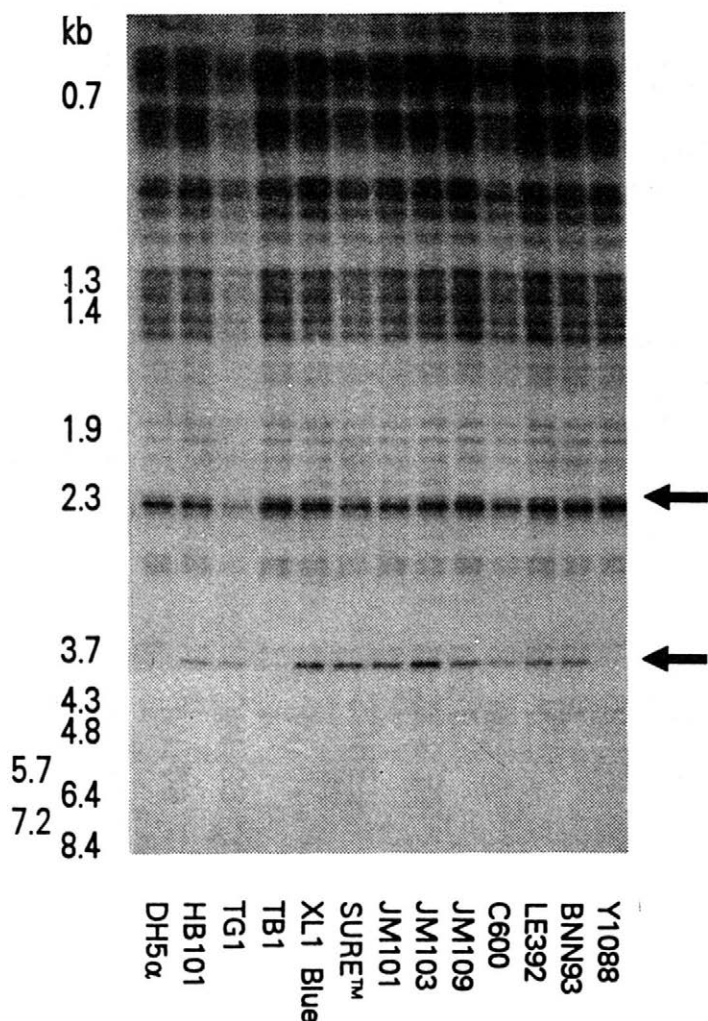


1. Hinf I restriction endonuclease profiles of 19 different strains from 17 bacterial species. Lambda DNA digested with Bst EII was used as a molecular weight standard

Using the (GTG)₅ probe it was possible to divide the 13 closely related laboratory *E. coli* strains into 3 groups on the basis of size and number of fragments which hybridized with (GTG)₅ probe (Fig. 3). The first consisted of strains DH5 α , TB1 and Y1088, second HB101, TG1, C600, LE392 and BNN93 and

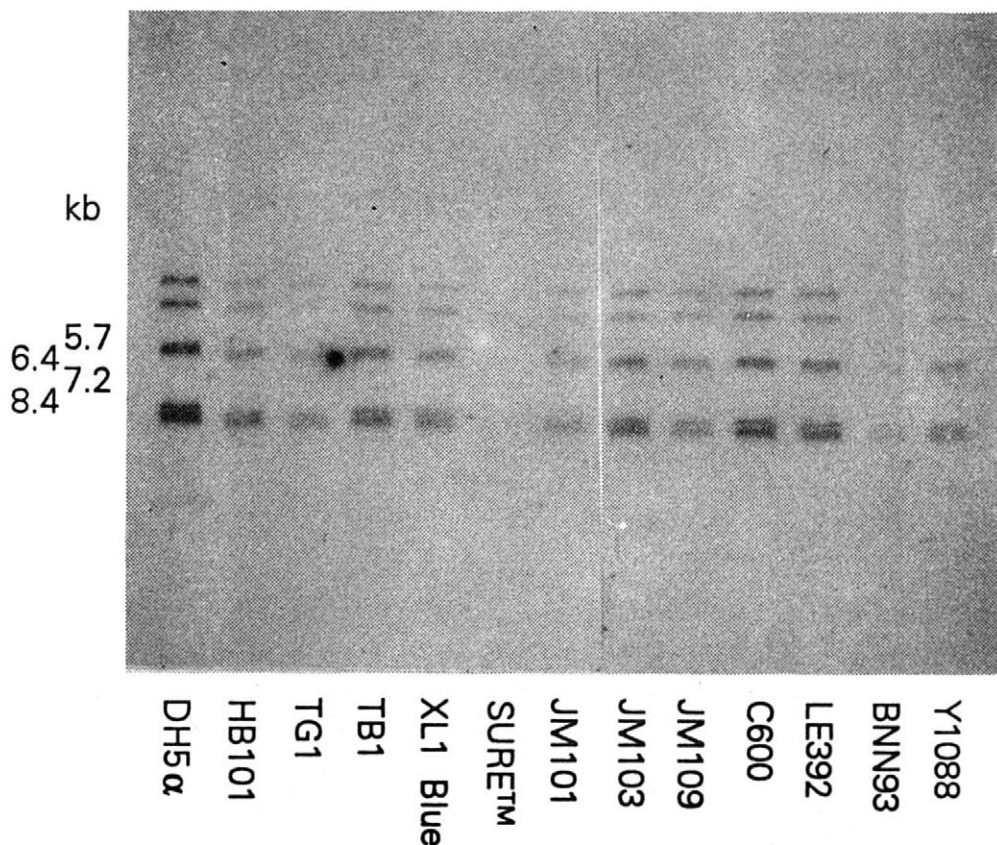


2. DNA fingerprinting of 19 different strains from 17 bacterial species after digestion with Hinf I and hybridization with radiolabelled oligonucleotide (GTG)₅. Molecular weights are as indicated



3. DNA fingerprinting of 13 laboratory *E. coli* strains after *Hinf* I digestion and hybridization with oligonucleotide (GTG)₅. Differences among strains are indicated with arrows

third of strains XL1 Blue, SURE[™], JM101, JM103 and JM109. When the oligoriboprobe was used following *Hinf* I digestion, only a single band appeared due to the presence of *Hinf* I recognition sites within rRNA genes. In all strains approximately 520 bp long fragment has been cut out of all the gene copies and hybridized with 20 bp long oligoriboprobe. Therefore for ribotyping it was necessary to cut chromosomal DNA with restriction endonuclease *Hind* III. After such a digestion and hybridization with oligoriboprobe, all the 13 strains gave rise to the identical fragment patterns (Fig. 4).



4. DNA fingerprinting (ribotyping) of 13 laboratory *E. coli* strains after Hind III digestion and hybridization with oligoriboprobe

We found that GTG fingerprinting can be used in all the bacterial strains so far tested (Fig. 2). A parameter which apparently strongly influenced the results is the GC content of the genome of the bacterium under the study. Bacteria with 30% GC content gave rise to only a limited number of bands (Fig. 2, Tab. I). However, the number of resulting fragments could be adjusted by altering the stringency during the hybridization and posthybridization washes. Any restriction endonuclease digesting the target DNA can be used, although the choice of enzyme may also influence the results. We preferred the use of 4 bp sequence-recognizing enzymes producing higher number of restriction fragments which resulted in the higher probability of differentiating between compared strains.

When comparing to ribotyping, GTG fingerprinting showed greater variability among the closely related laboratory strains of *E. coli* than did the ribotyping

which failed to show any differences. It may be explained by the probability that GTG rich regions are randomly distributed within the genome of the bacteria and their flanking regions are more complex and variable, while sequences around the rRNA genes are more stable.

Different probes have been so far used for fingerprinting bacteria (Laguerre et al., 1992; Nath et al., 1992; Pignatari et al., 1992; Stanley et al., 1992a). Some of them have a disadvantage of being useful only in limited number of species, while the others are difficult to standardize because of slightly different approach of the authors in the choice of the probe and restriction endonuclease (Martinetti and Altwegg, 1990; Nastasi et al., 1991; Izard et al., 1992; Scieux et al., 1992). On the other hand, work with oligonucleotide probes could offer a simple system available to any laboratory involved in DNA fingerprinting. GTG fingerprinting can be of special interest especially in those bacterial species where there is no other available system. The absolute definition of the probe sequence and well controlled hybridization and washing conditions could enable simple comparison of the results.

Acknowledgement

The authors wish to thank Dr. J. Vyhnálková and Dr. V. Růžicková, Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic, for supplying with different bacterial species.

References

- BLUMBERG, M. – RIMLAND, D. – KIEHLBAUCH, J. A. – TERRY, P. M. – WACHSMUTH, I. K.: Epidemiologic typing of *Staphylococcus aureus* by DNA restriction fragment length polymorphism of rRNA gene: elucidation of the clonal nature of a group of bacteriophage-non-typeable, ciprofloxacin-resistant, methicillin-susceptible *S. aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 1992: 362–369.
- CHOWDRY, N. – THRELFALL, E. J. – ROWE, B. – STANLEY, J.: Genotype analysis of faecal and blood isolates of *Salmonella* dublin from humans in England and Wales. *Epidem. Infect.*, 110, 1993: 217–225.
- CRAWFORD, A. M. – BUCHANAN, F. C. – FRASER, K. M. – ROBINSON, A. J. – HILL, D. F.: Repeat sequences from complex dsDNA viruses can be used as minisatellite probes for DNA fingerprinting. *Anim. Genet.*, 22, 1991: 177–181.
- DE MURO, M. A. – MITCHELL, W. J. – PRIEST, F. G.: Differentiation of mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from non-toxic varieties by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1992: 1159–1166.
- DOLL, L. – MOSHITCH, S. – FRANKEL, G.: Poly(GTG)₅-associated profiles of *Salmonella* and *Shigella* genomic DNA. *Res. Microbiol.*, 144, 1993: 17–24.

- EPPLEN, J. T.: Diagnostic application of repetitive DNA sequences. Clin. Chim. Acta, 209, 1992: S5-S13.
- GILL, P. - JEFFREYS, A. J. - WERRET, D. J.: Forensic application of DNA „fingerprints“. Nature, 318, 1985: 577-579.
- IZARD, N. C. - HACHLER, H. - GREHN, M. - KAYSER F. H.: Ribotyping of coagulase-negative staphylococci with special emphasis on intraspecific typing of *Staphylococcus epidermidis*. J. clin. Microbiol., 30, 1992: 817-823.
- JEFFREYS, A. J. - WILSON, V. - THEIN, S. L.: Hypervariable „minisatellite“ regions in human DNA. Nature, 314, 1985a: 67-73.
- JEFFREYS, A. J. - WILSON, V. - THEIN, S. L.: Individual-specific „fingerprints“ of human DNA. Nature, 316, 1985b: 76-79.
- JEFFREYS, A. J. - BROOKFIELD, J. F. Y. - SEMEONOFF, R.: Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. Nature, 317, 1985c: 818-819.
- KUNSTMAN, E. - BOCKER, T. - ROEWER, L. - SAUER, H. - MEMPEL, W. - EPPLEN, J. T.: Diagnosis of transfusion-associated graft-versus-host disease by genetic fingerprinting and polymerase chain reaction. Transfusion, 32, 1992: 766-770.
- LAGUERRE, G. - MAZURIER, S. I. - AMARGER, N.: Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. FEMS Microbiol. Ecol., 101, 1992: 17-26.
- LANG, J. W. - AGGARWAL, R. K. - MAJUMDAR, K. C. - SINGH, L.: Individualization and estimation of relatedness in crocodilians by DNA fingerprinting with a Bkm-derived probe. Mol. Gen. Genet., 238, 1993: 49-58.
- LUBJUN, T. - EPPLEN, C. - BRUN, J. - EPPLEN, J. T.: Multilocus fingerprinting using oligonucleotide probes reveals a highly polymorphic single locus system in great tits *Parus major*. Mol. Ecol., 2, 1993, 269-270.
- MARTINETTI, G. - ALTWEGG, M.: rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *Salmonella enteritidis*. Res. Microbiol., 141, 1990: 1151-1162.
- MCCABE, E. R. B.: Applications of DNA fingerprinting in pediatric practice. J. Pediatr., 120, 1992: 499-509.
- MEYER, W. - KOCH, A. - NIEMAN, C. - BEYERMANN, B. - EPPLEN, J. T. - BORNER, T.: Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. Curr. Genet., 19, 1991: 239-242.
- MITEVA, V. - ABADIJEVA, A. - STEFANOVA, T. T.: M13 DNA fingerprinting, a new tool for classification and identification of *Lactobacillus* spp. J. Appl. Bacteriol., 73, 1992: 349-354.
- NASTASI, A. - MAMMINA, C. - VILAFRATE, M. R.: rDNA fingerprinting as a tool in epidemiological analysis of *Salmonella typhimurium* infections. Epidemiol. Infect., 107, 1991: 565-576.
- NATH, K. - DEVLIN, D. - BEDDOE, A. M.: Heterogeneity in restriction patterns of *Gardnerella vaginalis* isolates from individuals with bacterial vaginosis. Res. Microbiol., 143, 1992: 1999-2209.
- PIGNATARI, A. - BOYKEN, L. D. - HERWALDT, L. A. - HOLLIS, R. - LEME, I. - SESSO, R. - PFALLER, M.: Application of restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA in the study of *Staphylococcus aureus* colonization in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 15, 1992: 195-199.

- PREHEIM, L. – PITCHER, D. – OWEN, R. – COOKSON, B.: Typing of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* strains by ribosomal RNA gene restriction patterns using a biotinylated probe. *European J. Microbiol. Infect. Dis.*, 10, 1991: 428–436.
- RYCHLÍK, I. – BARTOŠ, M. – ŠESTÁK, K.: Use of DNA fingerprinting for accurate typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Med. – Czech*, 39, 1994: 167–174.
- SAMBROOK, J. – FRITCH, E. F. – MANIATIS, T.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- SCIEUX, C. – GRIMONT, F. – REGNAULT, B. – GRIMONT, P. A. D.: DNA fingerprinting of *Chlamydia trachomatis* by use of ribosomal RNA, oligonucleotide and randomly cloned DNA probes. *Res. Microbiol.*, 143, 1992: 755–765.
- STANLEY, J. – MORENO, M. J. – JONES, C. – OWEN, R. J.: Molecular typing of *Helicobacter pylori* by chromosomal and plasmid organization. *Mol. Cell. Probes*, 6, 1992a: 305–312.
- STANLEY, J. – BURNENS, A. – LINTON, D. – ON, S. L. W. – COSTAS, M. – OWEN, R. J.: *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1992b: 2293–2303.
- STANLEY, J. – BURNENS, A. – POWELL, N. – CHOWDRY, N. – JONES, C.: The insertion sequence IS200 fingerprints chromosomal genotypes and epidemiological relationship in *Salmonella heidelberg*. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1992c: 2329–2336.
- STANLEY, J. – GOLDSWORTHY, M. – THRELFALL, E. J.: Molecular phylogenetic typing of pandemic isolates of *Salmonella enteritidis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 90, 1992d: 153–160.
- SULLIVAN, D. – BENNET, D. – HENMAN, M. – HARWOOD, P. – FLINT, S. – MULCAHY, F. – SHANLEY, D. – COLEMAN, D.: Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1993: 2124–2133.
- VOSMAN, B. – ARENS, P. – RUS-KORTEKAAS, W. – SMULDERS, M. J. M.: Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. *Theor. Appl. Genet.*, 85, 1992: 239–244.
- WEISBURG, W. G. – BARNS, S. M. – PELLETIER, D. A. – LANE, D. J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173, 1991: 697–703.
- YAN, W. – CHANG, N. – TAYLOR, D. E.: Pulse-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. *J. Infect. Dis.*, 163, 1991: 1068–1072.
- ZISCHLER, H. – NANDA, I. – SCHAFER, R. – SCHMID, M. – EPPLEN, J. T.: Digoxigenated oligonucleotide probes specific for simple repeats in DNA fingerprinting and hybridization in situ. *Hum. Genet.*, 82, 1989: 227–233.

Arrived on 27th April 1994

RYCHLÍK, I. – BEJČKOVÁ, L. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno):

Využití oligonukleotidu (GTG)₅ při DNA fingerprintingu bakterií.

Vet. Med – Czech, 39, 1994 (10): 567–578.

U 198 kmenů 19 různých bakteriálních druhů byla testována možnost využití syntetického oligonukleotidu (GTG)₅ při DNA fingerprintingu bakterií. Všechny vyšetřené bakterie po štěpení restrikční endonukleázou Hinf I reagovaly se sondou (GTG)₅. Počet pruhů po hybridizaci se značně lišil u jednotlivých kmenů a byl závislý na obsahu GC párů v DNA jednotlivých bakteriálních druhů. Skupina 13 přesně definovaných laboratorních kmenů *Escherichia coli* byla rozdělena do tří skupin za využití GTG fingerprintingu. Standardní ribotypizace v tomto případě neprokázala žádné rozdíly mezi studovanými kmeny. GTG fingerprinting je jednoduchá a spolehlivá metoda pro diferenciaci bakterií a díky univerzálnosti má své uplatnění zejména u těch bakteriálních druhů, kde žádné jiné typizační systémy nejsou dostupné.

DNA fingerprinting; diferenciacie baktérií; oligonukleotidová sonda (GTG)₅; ribotypizace

Contact Address:

RNDr. Ivan R y c h l í k , Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70,
621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29

OBSAH TESTOSTERONU VE TKÁNÍCH VARLAT A NADVARLAT PŘI HISTOPATOLOGICKÝCH ZMĚNÁCH VE VARLATECH BÝKŮ

F. Diba, A. Vinkler, L. Groch

Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Brno

Testosteron byl stanoven ze 42 varlat a nadvarlat 21 býků při různých mikroskopických změnách. Hladina testosteronu v testikulární tkáni u skupiny varlat bez histopatologických změn spermiogenního epitelu byla $9,2 \pm 6,77$ ng/g tkáně. V hlavě nadvarlete bylo $5,26 \pm 4,2$, v těle $5,4 \pm 4,0$ a v ocasu nadvarlete $3,23 \pm 3,26$ ng/g testosteronu. Při edematózním prosáknutí intersticia byla hladina testosteronu v testikulární tkáni $16,2 \pm 24,6$, v hlavě $6,2 \pm 3,59$, v těle $4,6 \pm 3,3$ a v ocasu nadvarlete $2,07 \pm 1,2$ ng/g. Při degenerativních změnách spermiogenního epitelu byla hladina testosteronu v testikulární tkáni $49,8 \pm 54,0$, v hlavě $5,62 \pm 5,6$, v těle $4,3 \pm 4,8$ a v ocasu nadvarlete $5,6 \pm 3,4$ ng/g. Při buněčných infiltracích a proliferacích intersticia byla hladina testosteronu v testikulární tkáni $52,7 \pm 47,6$, v hlavě $4,92 \pm 3,2$, v těle $4,6 \pm 3,0$ a v ocasu nadvarlete $4,34 \pm 4,0$ ng/g. Při stanovení hladiny testosteronu ze 42 varlat a nadvarlat 21 býků bylo v průměru zjištěno ve tkáni varlete $38,96 \pm 47,0$ ng/g testosteronu, v hlavě nadvarlete $5,7 \pm 4,7$, v těle $5,3 \pm 5,1$ a v ocasu nadvarlete $3,2 \pm 3,5$ ng/g tkáně. Při degenerativních změnách spermiogenního epitelu a při buněčných infiltracích a proliferacích byly zjištěny vyšší hladiny testosteronu ve tkáni varlete. Tyto hodnoty lze však považovat za ovlivněné nerovnoměrným podílem jednotlivých strukturálních částí parenchymů varlat k stanovení hmotnosti.

býk; varle; nadvarle; testosteron; histopatologické změny

Přítomnost hormonu ve varleti byla prokázána transplantační technikou (B e r t h o l d , 1849). Praktické využití testosteronu v posouzení jeho vlivu na funkce samců bylo možné až po jeho izolování (D a v i d a j . , 1935). Po jeho extrakci se výzkum zaměřil na zjištění buněk produkujících tento hormon (E i k - N e s , 1970). Tím byla vymezena vzájemná souhra mezi vyššími nervovými centry a pohlavními orgány samce. Od té doby byla řada studií zaměřena na sledování poruchy ejakulátu vzhledem k neurohumorálnímu řízení resp. nedostatku testosteronu (B i s h o p a W a l t o n , 1960; K ö n i g , 1962; R o s s a E n t w i s t l e , 1978). Tyto studie ukázaly, že vztah mezi hypothalamem, hypofýzou a varletem je určujícím faktorem jak při inkretorických, tak i při exkretorických funkcích varlete. Porucha funkcí nadřazených center může mít za

následek degeneraci spermiogenního epitelu, působení exogenních faktorů může dále způsobovat i edematozní prosáknutí a buněčné infiltrace a proliferace intersticia (L a d d s , 1985). Pokles koncentrace testosteronu v krevní plazmě býků po navození poruch termoregulace zjistili P r o b h a k a r aj. (1990), u kanců L a r s s o n aj. (1983), M a l m g r e n (1988), u člověka po dlouhodobém stresu A v a a g aj. (1978), D e K r e t s e r (1982), u beranů při degeneraci B l a n c h a r d aj. (1991a, b), u krys po podání antispermiogenních látek A o k i a F a w c e t t (1978). Naopak zvýšenou koncentraci testosteronu u býků s histopatologickými změnami ve varletní tkáni pozorovali V e e r a m a c h a n e n i aj. (1986), u kanců po podání kortikoidů L i p t r a p aj. (1975). Y a u n (1979) a V e e r a m a c h a n e n i aj. (1986) jako příčinu zvýšení hladin testosteronu uvádějí hyperplazii nebo hypertrofii Leydigových buněk vznikající při histopatologických změnách vždy v bezprostřední blízkosti postižených semenoplodných kanálků varlete. Tuto hyperplazii pozorovali i A o k i a F a w c e t t (1978) u myši po implantaci antispermatogenních látek pod *tunica albuginea* a došli k názoru, že semenoplodné kanálky se zúčastňují lokálního řízení Leydigových buněk. Jiní zase považují Sertoliho buňky za zodpovědné pro danou změnu tím, že produkují GnRH-like faktory (D e K r e t s e r , 1982; B h a s i n aj., 1983; N a g e n d r a n a t h aj., 1983), které mohou být tlumeny antagonisty GnRH (S h a r p e aj., 1980). Výše uvedené studie se zaměřili pouze na zjištění hladin testosteronu v periferní krvi jak specifických, tak i nespecifických hormonů řídících funkci pohlavních orgánů samce při histopatologických změnách. Naše studie má za cíl zjistit obsah testosteronu v testikulární a epididymální tkáni jak za fyziologických poměrů, tak i při histopatologických změnách ve varleti.

MATERIÁL A METODY

Pro sledování bylo použito 42 varlat a nadvarlat od 21 býků získaných bezprostředně po odporažení na jatkách. Býci byli ve věku 14 až 20 měsíců o hmotnosti 550 až 650 kg plemene českého strakatého, černostrakatého nížinného a jejich kříženci.

Po makroskopickém posouzení byla varlata zvážena. Později bylo bezprostředně přistoupeno k odběru vzorků na mikroskopické hodnocení a stanovení hladin testosteronu. Vzorky odebrané z 42 varlat po příčném řezu z *margo liber* o velikosti 1 x 1 x 1 cm byly fixovány v 10% formalinu. Po zalití do parafinu byly na mikrotomu typu Leitz 1280 firmy Reichert zhotoveny řezy o síle 5 μ , které byly fixovány na podložní sklíčko a dále barveny hematoxylin-eosinem. Posouzení bylo provedeno na světelném mikroskopu Laboval fy Carl Zeiss Jena při zvětšení 240x (15 x 10 x 1,6).

Podle histopatologického nálezu byla varlata rozdělena do čtyř skupin. První skupinu tvořilo sedm varlat bez histopatologického nálezu, ve druhé skupině bylo 22 varlat s nálezem různého stupně degenerativních změn spermiogenního epitelu. Ve třetí skupině bylo šest varlat s edematózním prosáknutím intersticia a čtvrtou skupinu tvořilo devět varlat se zjištěnými buněčnými infiltracemi a proliferacemi.

Hladiny testosteronu byly stanoveny z bezprostřední blízkosti míst odkud byly odebrány vzorky na histologické vyšetření. Vzorky o hmotnosti asi 1 g byly ihned uloženy do mrazničky až do doby stanovení testosteronu. Při stanovení ze tkáně byla po rozmrazení provedena homogenizace vzorku v třecí misce, důkladné promíchání homogenizátorem a vyluhování v etyléteru. Poté byl testosteron stanoven RIA metodou podle *Stupnického* (1975), modifikovanou *Píchovou* (1977). Vyhodnocení bylo provedeno programem RIA přímo v přístroji fy Beckman, LS 581. Obsah testosteronu byl stanoven na gram tkáně.

VÝSLEDKY

Ve skupině sedmi varlat bez histopatologického nálezu (tab. I) byla průměrná hmotnost varlat $312,9 \pm 52,8$ g s hladinou testosteronu $9,2 \pm 6,77$ ng/g tkáně. V hlavě nadvarlate byla zjištěna hladina testosteronu $5,26 \pm 4,2$, v těle $5,4 \pm 4,0$ a v ocase nadvarlate bylo $3,23 \pm 3,26$ ng/g tkáně. Při zjištění edematózního prosáknutí intersticia byla průměrná hmotnost šesti varlat $332,8 \pm 52,7$ g s obsahem $16,2 \pm 24,6$ ng/g testosteronu ve tkáni varlete. V jednotlivých částech nadvarlate bylo od hlavy k ocasu zjištěno $6,2 \pm 3,59$; $4,6 \pm 3,3$ a $2,07 \pm 1,2$ ng/g tkáně testosteronu. Při degenerativních změnách spermiogenního epitelu byla průměrná hmotnost 22 varlat $300,5 \pm 48,1$ g s obsahem testosteronu $49,8 \pm 54,0$ ng/g. V hlavě nadvarlate bylo zjištěno $5,62 \pm 5,6$, v těle $4,3 \pm 4,8$ a v ocasu $5,6 \pm 3,4$ ng/g testosteronu. Ve skupině buněčných infiltrací a proliferací intersticia byla průměrná hmotnost varlat $350,6 \pm 20,5$ g s obsahem $52,7 \pm 47,6$ ng/g testosteronu. V hlavě nadvarlate bylo $4,92 \pm 3,2$, v těle $4,6 \pm 3,0$ a v ocasu $4,34 \pm 4,0$ ng/g.

Průměrná hmotnost všech varlat (tab. I) byla $315,5 \pm 48,7$ g s obsahem testosteronu $38,98 \pm 47,0$ ng/g ve tkáni varlete, $5,7 \pm 4,7$ ng/g v hlavě nadvarlate, $4,3 \pm 4,0$ ng/g v těle nadvarlate a $3,4 \pm 3,3$ ng/g v ocasu nadvarlate.

DISKUSE

Poprvé přítomnost testosteronu potvrdil *Davida* (1935). Po nich *Lindner* (1959) izoloval testosteron z homogenátu testikulární tkáně v hodnotách od 1,6 do 6 μ g/g tkáně varlat, což jsou hodnoty výrazně vyšší než byly námi zjištěny ($38,98 \pm 47,0$ ng/g tkáně).

I. Obsah testosteronu ve tkáních varlat a nadvarlat při histopatologických změnách ve varlatech býků – Testosterone contents in the testicular and epididymal tissues at histopathological changes in the testes of bulls

Změny ve varleti ¹	n	Hmotnost varlat ⁷ (g)	Hladiny testosteronu (ng/g tkáně) ⁸			
			varle ⁹	nadvarle ¹⁰		
				hlava ¹¹	tělo ¹²	ocas ¹³
Bez histopatologického nálezu ²	7	312,86 ± 52,77	9,2 ± 6,77	5,26 ± 4,2	5,4 ± 4,0	3,23 ± 3,26
Edematózní prosáknutí intersticia ³	6	332,8 ± 52,69	16,2 ± 24,6	6,2 ± 3,59	4,6 ± 3,3	2,07 ± 1,2
Degenerativní změny spermiogenního epitelu ⁴	22	300,5 ± 48,1	49,8 ± 54,0	5,62 ± 4,8	4,3 ± 4,8	5,6 ± 3,4
Buněčné infiltrace a proliferace ⁵	7	350,6 ± 20,5	52,7 ± 47,6	4,92 ± 3,2	4,6 ± 3,0	4,34 ± 4,0
Celkem ⁶	42	315,5 ± 48,7	38,98 ± 47,0	5,7 ± 4,7	4,3 ± 4,0	3,4 ± 3,3

¹changes in testis, ²without histopathological change, ³oedematous infiltration of interstitium, ⁴degenerative changes of spermatogenic epithelium, ⁵cellular infiltration and proliferation, ⁶total, ⁷testis weight, ⁸testosterone levels (ng/g tissue), ⁹testis, ¹⁰epididymis, ¹¹head, ¹²corpus, ¹³cauda

Rozdílné hodnoty testosteronu v hlavě a ocasu nadvarlete byly potvrzeny též u jiných druhů zvířat (Frankel aj., 1970; Afjes aj., 1972; Pujol aj., 1976; Vreeburg aj., 1975; Amann a Ganjam, 1976). Tito autoři udávají rozdílné důvody pro rozdílné hladiny testosteronu mezi jednotlivými segmenty nadvarlete. V této souvislosti upozorňují, že hlava, tělo a proximální část ocasu nadvarlete jsou zásobovány arterií, která odstupuje z *a. spermatica interna* v oblasti *plexus pampiniformis*, druhá arterie, zásobující ocas nadvarlete, odstupuje z *a. iliaca interna* (Ganjam a Amann, 1976; Hammerstedt a Amann, 1976).

Vzhledem k tomu, že jsme stanovovali hladiny testosteronu nejen v hlavě a ocasu nadvarlete, ale i v těle nadvarlete a zjistili jsme sice postupný pokles hladin testosteronu od hlavy nadvarlete ($5,7 \pm 4,7$ ng/g) přes tělo ($4,3 \pm 4,0$ ng/g) až po ocas ($3,4 \pm 3,3$ ng/g), ale u některých býků vyšší hladiny v ocasu než v těle nadvarlete, dá se předpokládat, že na hladinách testosteronu v jednotlivých segmentech se může podílet jak testosteron přiváděný krevním řečištěm, tak testosteron vázaný na bílkovinu produkovanou Sertoliho buňkami, který zajišťuje jeho účinnou hladinu v semenoplodných kanálcích, odkud se s tokem tekutiny může dostávat do nadvarlete. Postupně klesající hladiny testosteronu odpovídají zčásti jeho metabolizaci tkání nadvarlat, kterou uvádí Hammerstedt a Amann (1976), kdy nejdříve vzniká biologicky účinnější dihydrotestosteron. Určité množství testosteronu se dostaví i do dalších částí vývodných cest a nachází se i v semenné plazmě býků a kanců (Kozumplík a Vinkler, 1982). Obsah testosteronu z jedné části varlete nemusí být reprezentativní pro celkovou tvorbu androgenů i když vyšetření více varlat z jednoho místa již, byť jen orientačně, určité hodnoty ukazuje. Dalo by se tedy spíše předpokládat, že čím větší varle (a v daném případě i vyšší obsah testosteronu v jeho tkáni), tím vyšší budou hodnoty testosteronu v těch částech nadvarlete, které bezprostředně přiléhají na vývodný systém varlat, z kterého přechází ve vazbě na androgen vázající bílkovinu. V našem sledování nebyl zjištěn vztah mezi hmotností varlat a obsahem testosteronu ve tkáni nadvarlat a mezi hladinami testosteronu ve tkáni varlat a nadvarlat.

Když se podíváme na průměrné hmotnosti nadvarlat zachycené v tab. I můžeme konstatovat, že v podstatě mohou odpovídat histopatologickému nálezu. Jestliže průměrná hmotnost varlat bez histopatologického nálezu byla $312,86 \pm 52,77$ g můžeme připustit, že edematózní prosáknutí intersticia může odpovídat vyšší průměrná hmotnost varlat $332,8 \pm 52,69$ g a naopak úbytek germinativní tkáně se může projevit menší hmotností varlat ($300,5 \pm 48,1$ g) ve skupině se zjištěnými degenerativními změnami spermiogenního epitelu. Se zmnožením tkáně intersticia ve skupině buněčných infiltrací a proliferací může souviset i nejvyšší průměrná hmotnost varlat ze sledovaného souboru, a to $350,6 \pm 20,5$ g.

Pokud se týká obsahu testosteronu ve varleční tkáni je možné naše zjištění vyšších hladin testosteronu ve tkáni varlat s infiltracemi a proliferacemi srovnat s výsledky autorů Věžík aj. (1990) a Kozdera (1991), kteří zjistili vyšší hladiny testosteronu v krvi býků po experimentálních infekcích varlat plísňemi. Někteří autoři jako příčinu zvýšení hladin testosteronu uvádějí hyperplazii Leydigových buněk (Aoki aj. 1978; Veeramachaneni aj., 1986). V našem šetření jsme se nezabývali sledováním stavu Leydigových buněk (sledování vyžaduje speciální vyšetřovací metody). Na základě názorů výše uvedených autorů předpokládáme, že příčinou zvýšení hladin testosteronu i v našem šetření mohou být hyperplazie Leydigových buněk. Tuto zvýšenou hladinu testosteronu zjistili i Aoki a Fawcett (1978), Yaun (1979) a Veeramachaneni aj. (1986). Naopak naše práce nesouhlasí s výsledky autorů, kteří zjistili pokles hladin testosteronu při degenerativních změnách spermiogenního epitelu u býků (Probhakar aj., 1990), u kanců (Larson aj., 1983; Malmgren, 1988), u člověka po dlouhodobém stresu (Aavaag aj., 1978; De Kretser, 1982), u beranů (Blanchard aj., 1991a, b). Předpokládáme, že tento rozdíl vznikl v důsledku změny v relativních poměrech jednotlivých strukturálních složek parenchymů varlat při přepočtu hladin testosteronu na hmotnost odebraných vzorků.

Podíváme-li se na obsah testosteronu ve tkáni nadvarlete, ani zde se neobjevuje žádný vztah mezi obsahem testosteronu v hlavě nadvarlete a tkáni nadvarlete (tab. I). Vyšší hladina testosteronu v ocasu nadvarlete než v těle nadvarlete ve skupině se zjištěnými degenerativními změnami pak svědčí ve prospěch názoru (Amann a Ganjam, 1976), že určité množství testosteronu se dostává do nadvarlete krevním řečištěm, především do ocasu nadvarlete jak to vyplývá z práce Goyala (1983) po aplikaci testosteronu orchidektomovaným býkům.

Literatura

- AAVAAG, A. – BENTHAL, O. – QUIGSTAD, K. – WALSTAD, P. – RONINGEN, H. – FONNUM, F.: Testosterone and testosterone binding globulin (TeBG) in young men during prolonged stress. *Int. J. Androl.*, 1, 1978: 22–31.
- AFJES, J. H. – VREEBURG, J. Th. M.: Distribution of 5 α -dihydrotestosterone in the epididymis of bull and boar and its concentration in the rat epididymis after ligation of different testicular ducts, castration, and unilateral gonadectomy. *J. Endocrinol.*, 53, 1972: 85–93.
- AMANN, R. P. – GANJAM, V. K.: Steroid production by bovine testis and steroid transfer across the pampiniform plexus. *Biol. Reprod.*, 15, 1976: 695–703.
- AOKI, A. – FAWCETT, D. W.: Is there a local feedback from the seminiferous tubules affecting activity of the Leydig cells? *Biol. Reprod.*, 19, 1978: 144–158.

- BERTHOLD, A. A.: Transplantation der Hoden. Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med., 16, 1849: 42–46.
- BHASIN, S. – HEBER, D. – PETERSON, M. et al.: Partial isolation and characterization of testicular GnRH-like factors. Endocrinology, 111, 1983: 1144–1146.
- BISHOP, B. P. – WALTON, A.: Spermatogenesis and the structure of spermatozoa. In: PARKERS, A. S. (ed.): Marshall's Physiology of Reproduction. 3rd ed. London, Longmans, Vol. I., Part II, 1960: 1–29.
- BLANCHARD, T. L. – VARNER, D. D. – BRETZLAFF, K. N. – ELMORE, R. G.: The cases and pathologic changes of testicular degeneration in large animals. Veter. Med., 86, 1991a: 531–536.
- BLANCHARD, T. L. – VARNER, D. D. – BRETZLAFF, K. N. – ELMORE, R. G.: Testicular degeneration in large animals. Identification and treatment. Veter. Med., 86, 1991b: 537–542.
- DAVID, K. – DINGEMANSE, E. – FREUD, J. – LAQUER, E.: Über Krystallinisches Hormon aus Hoden (Testosteron) wirksamer als aus Horn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. Z. Physiol. Chem., 233, 1935: 281.
- De KRETZER, D. M.: Sertoli cell – Leydig cell interaction in the regulation of testicular function. Int. J. Androl., 5, 1982: 11–17.
- EIK-NES, K.: Synthesis and secretion of androstenedione and testosterone. In: EIK-NES, K. (ed.): The Androgens of the Testis. 1970: 1–47.
- FRANKEL, A. I. – EIK-NES, K. B.: Metabolism of steroids in the rabbit epididymis. Endocrinology, 87, 1970: 646–652.
- GANJAM, V. K. – AMANN, R. P.: Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue and accessory sex glands secretions. Endocrinology, 99, 1976: 1618–1630.
- GOYAL, H. O.: Histquantitative effects of orchietomy with and without testosterone enanthate 3 treatment on the bovine epididymis. Amer. J. Vet. Res., 44, 1983: 1085–1090.
- HAMMERSTEDT, R. H. – AMANN, R. D.: Interconversions of steroids by intact bovine sperm and epididymal tissue. Biol. Reprod., 15, 1976: 686–694.
- KOZDERA, A.: Význam hladin testosteronu pro hodnocení plemenného býka. [Kandidátská disertace.] Brno 1991. 127 s. – Výzkumný ústav veterinárního lékařství.
- KOZUMPLÍK, J. – VINKLER, A.: Hladina testosteronu a 17- β -estradiolu v semenné plasmě býků a kančů. Veter. Med. (Praha), 27, 1982: 715–720.
- KÖNIG, H.: Zur Pathologie der Geschlechtesorgane beim Stier. Arch. Exp. Vet. Med., 16, 1962: 501–584.
- LADDS, P. W.: The Male Genital System. In: JUBB, K. V. F. – KENNEDY P. C.: Pathology of Domestic Animals. 3rd ed. Vol. 3, Chapter 5, 1985: 409–459.
- LARSSON, K. S. – EINARSSON, S. – LUNDSTRÖM, K. – HAKKARAIENEN, J.: Endocrine effects on heat stress in boars. Acta Vet. Scand., 24, 1983: 305–314.
- LINDNER, H. R.: Androgens in the bovine testis and spermatic vein blood. Nature, 183, 1959: 1605–1606.
- LIPTRAP, R. M. – RAESIDE, J. L.: Increase in plasma testosterone concentration after injection of adrenocorticotrophin into the boar. J. Endocrinol., 66, 1975: 123–131.
- MALMGREN, L.: Experimentally induced testicular alterations in boars. MSc. Thesis. Swed. Univ. Agric. Sci., Uppsala, Sweden, 1988.

NAGENDRANATH, N. – JOSE, T. M. – JUNETA, H. S.: Bioassayable GnRH-like in the spent nutrient medium of rat Sertoli cells in primary cultures. *Horm. Metabol. Res.*, 15, 1983: 99–102.

PÍCHOVÁ, D.: Kontrola estru a fertilní inseminace pomocí RIA stanovení progesteronu v mléce. [Závěrečná zpráva.] Uhřetěves, Výzkumný ústav živočišné výroby 1977.

PROBHAKAR, J. – CHIMBOMBI, M. – MALMGREN, L. – FREDERIKSSON, G. – MADEJ, A.: Effects on testosterone and LH concentrations of induced testicular degeneration in bulls. *Acta Vet. Scand.*, 31, 1990: 505–507.

PUJOL, A. – BAYARD, F. – LOUNET, J. – BOULARD, C.: Testosterone and dihydrotestosterone concentrations in plasma, epididymal tissues and seminal fluid of adult rats. *Endocrinology*, 98, 1976: 111–113.

SHARPE, R. M. – PHRASER, H. M.: Leydig cell receptors for LHRH and its agonist and their modulation by administration or deprivation of the releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 1980: 256–262.

ROSS, A. D. – ENTWISTLE, K. V.: The effect of scrotal insulation on spermatozoal morphology and the rates of spermatogenesis and epididymal passage of spermatozoa in the bull. *Theriogenology*, 11, 1978: 111–121.

STUPNICKI, R.: Direct radioimmunoassay of progesterone in plasma of farm animals. *Endokrinologie*, 66, 1975: 145–151.

VEERAMACHANENI, D. N. R. – OTT, R. S. – HEATH, E. H. – McENTEE, K. – BOLT, D. J. – HIXON, J. E.: Pathophysiology of small testes in beef bulls: Relationship between scrotal circumference, histopathologic feature of testes and epididymides, seminal characteristics and endocrine profiles. *Amer. J. Vet. Res.*, 47, 1986: 1988–1999.

VĚŽNÍK, Z. – ŠVECOVÁ, D. – RYŠAVÁ, D. a kol.: Responsibilita cílových tkání pohlavního systému v definovaném prostředí. [Závěrečná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1990. 80 s.

VREEBURG, G. T. M.: Distribution of testosterone and 5 α -dihydrosterone in rat epididymis and their concentration in efferent duct fluid. *J. Endocrinol.*, 67, 1975: 203–210.

YAUN, I.: Correlation of testicular pathology and reproductive performance in bulls used for artificial insemination. PhD Thesis, Cornell Univ., Ithaca, NY, 1979.

Došlo 10. 3. 1994

DIBA, F. – VINKLER, A. – GROCH, L. (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno):

Contents of testosterone in testicular and epididymal tissues with histopathological changes in the testes of bulls.

Vet. Med. – Czech, 39, 1994 (10): 579–587.

A total of 42 sexual organs of bulls were used to study the relationship between the level of testosterone and the effect of histopathological changes. Genital organs were obtained immediately after slaughter at the Brno abbatoir. Bulls were 14 to 20 months of age and weighed 450 to 650 kg, they were of the Czech Pied, Black and White breeds and their crossbreds.

After an assessment of testosterone contents in testicular and epididymal tissues and microscopic examination of organs the concentration of testosterone determined according to the histopathological findings were (Tab. I) as follows.

The mean content of testosterone in testicular homogenates was 38.96 ± 47.0 ng/g. The values for the head, corpus and cauda regions of the epididymal tissue were 5.7 ± 4.7 , 5.3 ± 5.1 and 3.2 ± 3.5 ng/g tissue, respectively. The mean level of testosterone in testicular homogenates in the group without histopathological changes of the spermatogenic epithelium was 9.2 ± 6.77 ; 5.26 ± 4.2 . In this group the concentration of 5.3 ± 4.2 from the head 5.4 ± 5.3 from the corpus and 3.23 ± 3.26 ng/g tissue were revealed in the cauda of the epididymis.

In the group with oedematous infiltration of the interstitium the mean level of testosterone in testicular tissue was determined 16.2 ± 24.6 , in the head of the epididymis it was 6.2 ± 3.59 , in the corpus 4.6 ± 3.3 and 2.07 ± 1.2 ng/g of testosterone was obtained from the cauda of the epididymis. In organs with degeneration of the spermatogenic epithelium the mean concentration of testosterone in the testicular tissue was about 49.8 ± 54.0 , in the head of the epididymis 5.62 ± 5.6 , in the corpus 4.3 ± 4.8 and in the cauda of the epididymis 5.6 ± 3.4 ng/g tissue was determined. In genital organs with cellular infiltration and proliferation of the spermatogenic epithelium the mean level of testosterone in the testicular tissue was 52.7 ± 47.6 ng/g tissue. In epididymal regions of the same group 4.9 ± 3.2 , 4.6 ± 3.0 , 4.3 ± 4.0 ng/g from the head, corpus and cauda of the epididymis were obtained, respectively.

It can be concluded that the higher testosterone levels from the testicular tissue were obtained in sexual organs with degeneration of the spermatogenic epithelium and cellular infiltration of the interstitial cells.

bull; testis; epididymis; testosterone; histopathological changes

Contact Address:

MVDr. Fantahun D i b a , CSc., Vysoká škola veterinární a farmaceutická,
Palackého 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic
Tel. 05/41 32 11 07, fax 05/41 21 11 51

Upozorňujeme čtenáře, že číslo 11/1994 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

**bude věnováno Ústavu experimentální veterinární medicíny
v Košicích a měly by v něm být uveřejněny tyto práce:**

Prehľad publikačnej činnosti

L a z á r L., M a r a č e k I.: Growth and development of follicles in different phases of the oestrous cycle in cows in relation to the presence of the corpus luteum and an oestrogen-dominant follicle

Z á v a d o v á J., Š v r č e k Š.: Zdokonalenie laboratórnej diagnostiky besnoty a titrácie vírusu besnoty

B o m b a A., K r a v j a n s k ý I., K a š t e ľ R., Č í ž e k M., K a p i t a n č i k B., J u h á s o v á Z., H e r i c h R., Ž i t ň a n R., B u č k o V.: Kolonizácia tráviaceho traktu gnotobiotických a konvenčných jahniat definovanou laktoflórou

F o t t a M., G o n d o ľ J.: Stafylokoková enterotoxikóza – alimentárne ochorenie

V i l č e k Š.: Vývoj PCR testov na detekciu vírusov respiračného syndrómu hovädzieho dobytku

M a r c i n A., F e n c í k R., B e l i č k o v á E., S i k l e n k a P.: Dot-blot technika pre kvantitatívne stanovenie pšeničného proteínu v sálách

IMUNOGÉNNOSŤ VAKCÍNY PROTI ENZOOTICKÉMU POTRATU OVIEC

E. Gajdošová, E. Kováčová, J. Kazár, A. Kolcunová, A. Sabó

Virologický ústav SAV, Bratislava

V pokusoch na ovciach a laboratórnych bielych myšiach sme sledovali imunogénnosť vakcíny proti enzootickému potratu oviec, pozostávajúcej z purifikovaných a formálnom inaktivovaných korpuskúl *Chlamydia psittaci*. U oviec v intervaloch 1, 3 a 6 mesiacov po jednej dávke vakcíny a 2 týždne, 2 a 5 mesiacov po druhej dávke vakcíny (podanej mesiac po prvej dávke) sme porovnávali protilátkovú odpoveď v reakcii väzby komplementu (RVK) a metódou ELISA s výsledkami testu blastickej transformácie lymfocytov (BTL). Zatiaľ čo protilátkovú odpoveď v RVK sme ojedinele zaznamenali len po podaní vyššej dávky (100 µg) vakcíny, v metóde ELISA boli od 3. mesiaca po vakcinácii pozitívne séra všetkých oviec, okrem tých, ktoré dostali iba jednu nižšiu (20 µg) vakcinačnú dávku. Naproti tomu pozitívitu v teste BTL sme pozorovali vo všetkých povakcinačných intervaloch, bez ohľadu na veľkosť a počet dávok vakcíny. Imunizácia myší jednou dávkou (100 µg) vakcíny signifikantne, ale nie úplne znižovala rozmnožovanie *Chlamydia psittaci* v pľúcach myší.

enzootický potrat oviec; *Chlamydia psittaci*; inaktivovaná vakcína; povakcinačná imunita

Enzootický potrat oviec (EPO) je známy už od 50. rokov ako samostatná nozologická jednotka spôsobovaná chlamýdiami (S t a m p a i., 1950). Na závažnosť ochorenia a značné straty, ktoré môže *Ch. psittaci* v chovoch oviec u nás zapríčiniť, upozornili v sérii prác S á d e c k ý a i. (1978) a T r á v n i č e k a i. (1977, 1978), ktorí tiež *Ch. psittaci* ako pôvodcu EPO izolovali a identifikovali.

Prvé snahy o ochranu oviec pred touto chorobou ich vakcináciou sú známe krátko po jej objavení (M c E w e n a F o g g i e, 1954). Od toho času sa používali na prevenciu EPO inaktivované chlamýdiové vakcíny, avšak s rôznym úspechom (L i n k l a t e r a D y s o n, 1979; A n d e r s o n a i., 1990). Vychádzajúc z výskytu EPO a koxielózy u nás, sme vo Virologickom ústave SAV vyvinuli vakcíny proti týmto jednotlivým ochoreniam, ako aj kombinovanú vakcínu. Pri sledovaní imunogénnosti chlamýdiovej vakcíny u oviec hodnotením protilátkovej odpovede dokazovanej reakciou väzby komplementu (RVK) sa však zistilo, že časť oviec reaguje pozitívne v závislosti od dávky vakcíny (D r a v e c k ý a i., 1987).

V tejto práci sme porovnali u oviec imunogénnosť vakcíny, pripravenej z purifikovaných a inaktivovaných elementárnych teliesok homológneho kmeňa *Ch. psittaci* hodnotením povakcinačnej protilátkovej odpovede nielen v RVK, ale aj imunoenzymatickou metódou (ELISA) a sledovaním povakcinačnej bunkovej imunitnej odpovede testom blastickéj transformácie lymfocytov (BTL). U bielych laboratórnych myší sme sledovali ich ochranu pred intranazálnou (i.n.) infekciou *Ch. psittaci*.

MATERIÁL A METÓDY

Na prípravu vakcíny, antigénov a na infekciu myší sme použili kmeň PK-5082 *Ch. psittaci*, pôvodcu EPO, ktorý u nás izolovali S á d e c k ý a i. (1978). Vakcínu proti EPO predstavovali purifikované a formalínom inaktivované korpuskuly *Ch. psittaci*, pripravené z infikovaných žltkových vakov kuracích embryí diferenciálnou centrifugáciou, éterovou extrakciou a pôsobením trypsínu.

Pokus sme robili na 10 ovciach (jarkách) plemena slovenské merino, ktoré boli pred vakcináciou sérologicky negatívne v RVK a nereagovali v teste BTL. Ovce sme imunizovali subkutánne (s.c.) 2 ml vakcíny, obsahujúcej 100 µg (jarky č.1-4), resp. 20 µg (jarky č.5-8) korpuskúl *Ch. psittaci*. Kontrolná skupina (jarky č.9-10) dostala s.c. rovnaký objem fyziologického roztoku. Po mesiaci sme podali druhú dávku vakcíny, a to jarkám č. 1-2 po 100 µg a jarkám č.5-6 po 20 µg. Krv na sérologické vyšetrenie a na test BTL sme všetkým ovciam odobrali z v. juguláris pred vakcináciou a v intervaloch 1, 3 a 6 mesiacov po vakcinácii. Tie ovce, ktoré dostali druhú dávku vakcíny boli vyšetrené tiež 2 týždne po jej podaní.

V RVK sme séra vyšetřili teplou metódou po inaktivácii pri teplote 56 °C po dobu 30 minút (B r e z i n a a Ú r v ö l g y i, 1959) s korpuskulárnym antigénom homológneho kmeňa *Ch. psittaci*. Za pozitívne sme považovali séra reagujúce v riedení $\geq 1 : 8$.

V metóde ELISA sme použili 5 µg korpuskulárneho antigénu *Ch. psittaci* na jamku. Po naadsorbovaní antigénu sme pridali vyšetřované séra (natívne) v riedení 1 : 1 000 a po príslušnej inkubácii peroxidázou značený anti-koží-ovčí konjugát (ÚSOL, Praha). Reakciu sme znázornili pridaním ortho-phenylén-diamínu ako substrátu, riedeného v citrátovom pufri a odčítali pri optickej denzite (OD₄₉₂). Vypočítali sme priemernú hodnotu adsorbancie z 10 sér jariet, získaných pred vakcináciou, ktorú sme násobili dvoma. Získaná hodnota bola 1,34 (K o v á č o v á a i., 1987).

Na test BTL sme použili periférne mononukleárne bunky, ktoré sme získali po centrifugácii heparinizovanej krvi na gradiente Ficoll-Verografin. Inkorporácia metyl-³H tymidínu bola indikátorom blastogenézy. Rádioaktivitu sme merali v scintilačnom počítaci (LKB 1217, Rackbeta, Sweden) a vyhodnotili v impul-

zoch/min. Výsledky sme vyjadrili stimulačným indexom (SI), ktorý predstavuje pomer impulzov testovanej vzorky k impulzom zodpovedajúcej autológnej kontroly (Gajdošová a Brezina, 1989). Za pozitívny sme považovali $SI \geq 2$.

Biele laboratórne myši 10–12 g (SPF, chov Velaz) sme imunizovali s.c. dávkou 100 μ g vakcíny. Štyri týždne po vakcinácii sme ich sérologicky vyšetrili v RVK a infikovali intranazálne (i.n.) v narkóze čelenžujúcimi dávkami 10^5 a 10^6 EID₅₀ homologného kmeňa *Ch. psittaci*. Na 4. deň sme uhynutým, ale aj prežívajúcim myšiam po usmrtení vypitvali pľúca, z ktorých sme z obidvoch lalokov urobili otláčkové preparáty, zafixovali nad plameňom a farbili podľa Giménez a (1964). Paralelne sme vyšetrovali myši kontrolné, rovnako infikované, ale neimunizované vakcínou. Stupeň rozmnožovania chlamýdií v pľúcach myší sme predbežne hodnotili mikroskopicky. Z pľúc sme pripravili 20% suspenzie v BHI (brain-heart infusion, fy Oxoid), ktoré sme potom titrovali na 6-dňových kuracích embryách očkovaním do žltkového vaku a hodnotením prítomnosti chlamýdií od 5. do 11. dňa po očkovaní u uhynutých embryí a na 12. deň po očkovaní u živých embryí. Výťažok z myších pľúc, vyjadrený titrom chlamýdií v žltkových vakoch kuracích embryí sme stanovili v EID₅₀/ml.

VÝSLEDKY

V RVK po vakcinácii jednou dávkou (100 μ g) reagovala iba jedna jarka (č. 4) v intervale 3 mesiace po vakcinácii, aj to iba v nízkom riedení séra (1 : 16). Opakované podanie druhej dávky vakcíny viedlo k pozitívite oviec v RVK v prípade vyššej dávky (jarky č. 1–2) v intervale 2 týždne a 2 mesiace po vakcinácii v riedeniach sér 1 : 32–1 : 64. Pri hodnotení metódou ELISA (tab. I) pred imunizáciou, ako aj prvý mesiac po imunizácii boli všetky vzorky sér negatívne. Tretí mesiac sme zaznamenali najvyššie hodnoty u tých jariet, ktoré dostali dve dávky po 100 μ g (OD₄₉₂ 2,570–2,750). Hodnoty po jednej dávke (100 μ g) boli nižšie (1,900–1,910). Po podaní dvoch dávok po 20 μ g boli hodnoty OD₄₉₂ v rozmedzí od 1,734 do 1,784. Po imunizácii jednou dávkou vakcíny (20 μ g) sme získali negatívne výsledky (0,907–1,180). Za šesť mesiacov po imunizácii mali hodnoty klesajúcu tendenciu, pričom najvyššie zostali po dvojitej dávke po 100 μ g (2,020–2,170); nižšie po jednej dávke (100 μ g) (1,723–1,814) a najnižšie po dvojitej dávke 20 μ g (1,660–1,680). Rovnako ako po 3 mesiacoch aj po 6 mesiacoch s dávkou 20 μ g sme nedokázali prítomnosť protilátok. Za dva týždne po podaní druhej dávky vakcíny (100, resp. 20 μ g) boli pozitívne hodnoty len v prípade vyššej dávky (2,220–2,570). V kontrolnej skupine boli hodnoty negatívne vo všetkých sledovaných intervaloch.

Z výsledkov testu BTL vyplýva (tab. II), že v čase pred imunizáciou boli všetky vyšetrované jarky negatívne ($SI < 2$). Kontrolné, neimunizované jarky boli

I. Protilátková odpoveď po imunizácii oviec vakcínou proti EPO hodnotená metódou ELISA – Antibody response after immunization of sheep with vaccine against EPO, evaluated by ELISA

Zviera č. ¹	Dávka ² (µg)	Intervaly po imunizácii v mesiacoch s hodnotami OD ₄₉₂ ³				
		0*	1	1(1/2)**	3(2)**	6(5)**
1	100 + 100	0,456	0,760	2,220	2,570	2,020
2	100 + 100	0,540	0,670	2,570	2,750	2,170
3	100	0,600	0,800		1,900	1,723
4	100	0,832	0,900		1,910	1,814
5	20 + 20	0,733	0,945	1,300	1,784	1,660
6	20 + 20	0,863	0,670	1,220	1,734	1,680
7	20	0,741	0,670		0,907	0,850
8	20	0,780	0,930		1,180	1,000
9	kontrola ⁴	0,585	0,630		0,890	0,702
10	kontrola	0,570	0,640		0,705	0,820

* – pred vakcináciou – before vaccination

** – zátvorkách mesiace po druhej vakcinačnej dávke – in parentheses months after the second dose of vaccine

¹animal No., ²dose, ³intervals after immunization in months with values of OD₄₉₂, ⁴control

tiež negatívne vo všetkých ďalších intervaloch. Pozitívitu v teste BTL sme pozorovali u všetkých jariet už od 1. mesiaca po imunizácii s vyššími hodnotami po podaní vyššej dávky (100 µg) vakcíny (SI od 3,95 do 4,69). Po podaní druhej dávky došlo k podstatnému zvýšeniu hodnôt SI (6,32–7,76) v prípade 100 µg vakcíny oproti 20 µg vakcíny, kde bolo len nepatrné zvýšenie SI (z 3,12 na 3,25 a z 2,67 na 3,19). Ďalšie vyšetrenia za 3 a 6 mesiacov po imunizácii ukázali, že stav celulárnej imunity, hodnotený testom BTL, sa prakticky nemenil.

Zatiaľ čo kontrolné myši, infikované vyššou dávkou 10⁶EID₅₀ hynuli, alebo boli zjavne choré, kontrolné myši infikované nižšou dávkou neprejavovali známky ochorenia. Po vyššej infekčnej dávke (10⁶EID₅₀) bol titer chlamýdií v pľúcach myši kontrolných 10^{8.1}EID₅₀ a u imunizovaných 10^{5.7}EID₅₀. Po nižšej infekčnej dávke (10⁵EID₅₀) sa v pľúcach myši chlamýdie množili s výťažkom 10^{7.3}EID₅₀, ale v imunizovaných myšiach iba s výťažkom 10^{5.2}EID₅₀. Titer protilátok v zmesi sér imunizovaných myši pred infekciou (4 týždne po imunizácii) bol 1 : 64 v RVK. Takže imunizácia myši jednou dávkou korpuskulárnej chlamýdieovej vakcíny signifikantne (viac ako 2 log jednotky) znižovala rozmnožovanie chlamýdií v pľúcach myši (tab. III).

II. Celulárna imunitná odpoveď po imunizácii oviec vakcínou proti EPO hodnotená testom BTL – Cellular immune response after immunization of sheep with vaccine against EPO evaluated by BTL test

Zviera č. ¹	Dávka ² (µg)	Intervaly po imunizácii v mesiacoch s hodnotami SI ³				
		0*	1	1(1/2)**	3(2)**	6(5)**
1	100 + 100	1,38	3,95	6,32	6,55	6,43
2	100 + 100	1,56	4,28	7,76	7,50	7,51
3	100	1,68	4,69		5,00	5,18
4	100	0,91	4,30		4,63	4,55
5	20 + 20	1,27	3,12	3,25	3,40	3,50
6	20 + 20	1,13	2,67	3,19	3,52	3,47
7	20	1,00	3,18		3,25	3,00
8	20	0,96	2,94		3,06	2,97
9	kontrola ⁴	1,15	1,36	1,35	1,28	1,63
10	kontrola	1,34	1,18	1,14	1,02	0,98

* – pred vakcináciou – before vaccination

** – v zátvorkách mesiace po druhej vakcinačnej dávke – in parentheses months after the second dose of vaccine

¹ animal No., ² dose, ³ intervals after immunization in months with values of stimulation indices, ⁴ control

III. Ochrana myší pred intranazálnou infekciou *Ch. psittaci* po predchádzajúcej imunizácii vakcínou proti EPO – Protection of mice against *Ch. psittaci* intranasal infection previously immunized with vaccine against EPO

Pokus ¹	Imunizačná dávka ⁴	Čelenžujúca dávka ⁵	log ₁₀	Rozdiel log ₁₀
Skupina ²			EID ₅₀ *	EID ₅₀ **
I. pokus	100 µg	10 ⁶ EID ₅₀	5,7	2,4
I. kontrola ³		10 ⁶ EID ₅₀	8,1	
II. pokus	100 µg	10 ⁵ EID ₅₀	5,2	2,1
II. kontrola		10 ⁵ EID ₅₀	7,3	

* – stupeň množenia chlamýdií v pľúcach myší (titrácie v žĺtkových vakoch kuracích embryí) – degree of multiplication of *Chlamydiae* in the lungs of mice (titrations in chicken embryo yolk sacs)

** – rozdiel medzi pokusnou a kontrolnou skupinou v titroch množenia *C. psittaci* – difference between experimental and control group in titers of multiplication of *C. psittaci*

¹ experiment, ² group, ³ control, ⁴ immunizing dose, ⁵ challenge dose

Hodnotenie imunity po infekcii *Ch. psittaci* u domácich a laboratórnych zvierat je komplikované zvláštnosťou vývojového cyklu chlamýdií, ich schopnosťou perzistovať v infikovaných bunkách hostiteľa a imunomodulačným pôsobením *Ch. psittaci* (McCarthy, 1990). Vzhľadom na to, že ide o obligátneho vnútrobunkového parazita, dôležitú úlohu pri poinfekčnej chlamýdievej imunite hrajú nielen protilátky, ale predovšetkým bunková imunita.

Naše výsledky porovnávajúce humorálne a bunkové parametre imunity nasvedčujú tomu, že to platí aj pre hodnotenie povakcinačnej imunity. Zatiaľ čo test BTL odrážajúci bunkovú imunitnú odpoveď bol pozitívny vo všetkých povakcinačných intervaloch, bez ohľadu na počet a veľkosť vakcinačných dávok, protilátková odpoveď dokazovaná metódou ELISA bola len selektívne pozitívna v závislosti od povakcinačného intervalu, ako aj od počtu a veľkosti vakcinačných dávok. Sérologické vyšetrenie povakcinačnej protilátkovej odpovede v RVK sa ukázalo v porovnaní s metódou ELISA ako málo citlivé a nespoľahlivé, v súlade s pozorovaním Andersona a i. (1990), ktorí považujú výsledky RVK za variabilné a nekorelujúce s odolnosťou voči infekcii. Z uvedeného vyplýva nutnosť nahradiť vyšetrovanie premorenia chovov oviec *Ch. psittaci* a hodnotenie povakcinačnej protilátkovej odpovede metódou ELISA namiesto doposiaľ používanej RVK. Sérologické vyšetrenie povakcinačnej protilátkovej odpovede možno tiež doplniť testom BTL, alebo dostupnejším kožným alergickým testom, ktoré odrážajú bunkovú imunitu (Wilsmore a i., 1984).

Otvorenou zostáva otázka, či zistené parametre humorálnej a bunkovej imunity u oviec zodpovedajú ich ochrane pred prirodzenou, alebo experimentálnou chlamýdieovou infekciou. Ochrana oviec vakcinovaných inaktivovanými korpuskulami *Ch. psittaci* pred experimentálnou infekciou pôvodcom EPO, pozorovaná inými autormi, korelovala s protilátkovou odpoveďou hodnotenou imunoblotovou analýzou povakcinačných sér (Anderson a i., 1990), alebo metódou ELISA (Wilsmore a i., 1990). Pretože v našich podmienkach si ťažko môžeme dovoliť experimentálnu infekciu oviec *Ch. psittaci*, použili sme na hodnotenie účinnosti vakcín model i.n. infekcie laboratórnych bielych myší, u ktorých sme dokázali významný stupeň ochrany, podobne ako v prípade kombinovanej vakcíny proti infekcii *Ch. psittaci* a *Coxiella burnetii* (Kazár a Schrammek, 1980), nie však úplnú zábranu rozmnožovania chlamýdií. K podobným výsledkom dospeli Johnson a Hobson (1986) pri hodnotení účinnosti chlamýdievej vakcíny na myšiach po intracerebrálnej infekcii *Ch. psittaci*.

Literatúra

ANDERSON, I. E. – TAN, T. W. – JONES, G. E. – HERRING, A. J.: Efficacy against ovine enzootic abortion of an experimental vaccine containing purified elementary bodies of *Chlamydia psittaci*. Vet. Microbiol., 24, 1990: 21–27.

- BREZINA, R. – ÚRVÖLGYI, J.: Sérologická evidencia premorenosti chovov domácich zvierat vírusom zo skupiny bedsonia (psitakóza-ornitóza-savčia pneumónia) na západnom Slovensku. Vet. Čas., 8, 1959: 532–537.
- DRAVECKÝ, T. – KAZÁR, J. – ŽÁRSKY, I. – SCHRAMEK, Š. – ÚRVÖLGYI, J. – TRÁVNÍČEK, M. – BALÁŠČÁK, J.: Sledovanie reaktogenosti a imunogenosti kombinovanej vakcíny proti koxielóze a chlamýdióvému potratu oviec. Veter. Med. (Praha), 32, 1987: 309–313.
- GAJDOŠOVÁ, E. – BREZINA, R.: Cell-mediated immune response to *Coxiella burnetii* antigens in Q fever convalescents and vaccinees. Acta Virol., 33, 1989: 471–481.
- GIMENÉZ, D. F.: Staining rickettsiae in yolk sac-cultures. Stain Technol., 39, 1964: 135–140.
- JOHNSON, F. W. A. – HOBSON, D.: Intracerebral infection of mice with ovine strains of *Chlamydia psittaci*: an animal screening test for the assay of vaccines. J. Comp. Path., 96, 1986: 497–505.
- KAZÁR, J. – SCHRAMEK, Š.: Sérologická odpoveď a odolnosť voči infekcii u myší imunizovaných rôznymi kombináciami korpuskulárných antigénov *Chlamydia psittaci* a *Coxiella burnetii*. In: Zbor. Konf. o aktuálnych zdravotných a produkčných problémoch oviec v súčasných podmienkach chovu. Košice, 1980: 49–53.
- KOVÁČOVÁ, E. – GALLO, J. – SCHRAMEK, Š. – KAZÁR, J. – BREZINA, R.: *Coxiella burnetii* antigens for detection of Q fever antibodies by ELISA in human sera. Acta Virol., 31, 1987: 254–259.
- LINKLATER, K. A. – DYSON, D. A.: Field studies on enzootic abortion of ewes in south-east Scotland. Vet. Rec., 105, 1979: 387–389.
- McCAFFERTY, M. C.: Immunity to *Chlamydia psittaci* with particular reference to sheep. Vet. Microbiol., 25, 1990: 87–99.
- McEWEN, A. D. – FOGGIE, A.: Enzootic abortion of ewes: comparative studies of different vaccines. Vet. Rec., 66, 1954: 393–397.
- SÁDECKÝ, E. – TRÁVNÍČEK, M. – BALÁŠČÁK, J. – BREZINA, R. – KAZÁR, J. – ÚRVÖLGYI, J. – FLEŠÁR, M. – ČIŽMÁR, J.: Enzootický potrat oviec v okrese Rožňava. Veter. Med. (Praha), 23, 1978: 25–28.
- STAMP, J. T. – McEWEN, A. D. – WATT, J. A. A. – NISBET, D. I.: Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. Vet. Rec., 62, 1950: 251–254.
- TRÁVNÍČEK, M. – SÁDECKÝ, E. – BALÁŠČÁK, J. – KAZÁR, J. – ÚRVÖLGYI, J. – BREZINA, R. – MITTERPAK, J.: Hromadné chlamýdióvé potraty oviec na východnom Slovensku. Veterinárství, 27, 1977: 36–37.
- TRÁVNÍČEK, M. – ÚRVÖLGYI, J. – SÁDECKÝ, E. – BALÁŠČÁK, J. – BREZINA, R. – KAZÁR, J. – GAZDIČ, J. – MITTERPAK, J.: Izolácia a identifikácia *Chlamydia psittaci* ako pôvodcu enzootického potratu oviec na východnom Slovensku. Veter. Med. (Praha), 23, 1978: 479–483.
- WILSMORE, A. J. – ABDULJALH, S. A. – PARSONS, V. H. – DAWSON, M.: Observations on a skin sensitive test for ovine enzootic abortion. Brit. Vet. J., 140, 1984: 468–476.
- WILSMORE, A. J. – WILSMORE, B. C. – DAGNALL, G. J. R. – IZZARD, K. A. – WOODLAND, R. M. – DAWSON, M. – VENABLES, C.: Clinical and immunological responses of ewes following vaccination with an experimental formalin-inactivated *Chlamydia psittaci* (ovis) vaccine and subsequent challenge with the live organisms during pregnancy. Brit. Vet. J., 146, 1990: 341–348.

Došlo 25. 4. 1994

GAJDOŠOVÁ, E. – KOVÁČOVÁ, E. – KAZÁR, J. – KOLCUNOVÁ, A. – SABÓ, A.
(Institute of Virology of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava):

Immunogenicity of vaccine against enzootic abortion of ewes.

Vet. Med. – Czech., 39, 1994 (10): 589–596.

Immunogenicity of vaccine against enzootic abortion of ewes (EPO) was evaluated in sheep and laboratory white mice. The vaccine contained purified and formalin-inactivated corpuscles of *Chlamydia psittaci*. Experiment was performed on ten sheep, Slovak Merino breed, which were negative before vaccination in serological assays and blastic transformation of lymphocytes (BTL) tests. The animals were immunized subcutaneously with 2 ml of vaccine which contained 100 µg (sheep No. 1–4) and 20 µg (sheep No. 5–8) corpuscles of *C. psittaci*. Control group (No. 9–10) received the same volume of physiological saline. The second dose of vaccine was given one month after the first dose (No. 1–2 – 100 µg each, and No. 5–6 – 20 µg each). Blood for serological evaluation and BTL test was taken before vaccination and 1, 3, and 6 months after vaccination. The sheep which were given the second dose of vaccine were also evaluated two weeks thereafter. Antibody response in complement fixation reaction (CFR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was compared with the results of BTL. While the antibody response evaluated by CFR was sporadically positive after administration of the higher dose of vaccine only, in ELISA all sera were positive except one lower dose of vaccine (Tab. I). In all post-vaccination intervals positivity was confirmed by BTL test irrespective of the size and number of vaccine dose (Tab. II). Immunization of mice with one dose (100 µg) of vaccine significantly but not completely reduced multiplication of *C. psittaci* in the lungs of mice (Tab. III).

enzootic abortion of ewes; *Chlamydia psittaci*; inactivated vaccine; post-vaccination immunity

Contact Address:

RNDr. Eva Gajdošová, CSc., Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9,
842 46 Bratislava, Slovak Republic
Tel. 07/378 35 25, fax 07/37 42 84

MELANOBLASTOMOVÁ NEMOC U LABORATORNÍCH MINIPRASAT: MODEL PRO STUDIUM LIDSKÝCH MALIGNÍCH MELANOMŮ

K. Fortýn¹, V. Hruban², V. Horák³, J. Hradecký³, J. Tichý⁴

¹Chirurgické oddělení, nemocnice Semily

²Vysoká škola zemědělská, Praha

³Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Liběchov

⁴Patologicko-anatomické oddělení, nemocnice Turnov

U tmavě pigmentovaných laboratorních miniprasat byly pozorovány primární kožní maligní melanomy a rovněž rozsáhlé metastázy v různých orgánech. Primární nádory byly převážně mnohočetné a měly tubero-nodulární tvar. Pravidelný výskyt nádorů u potomků ze tří kombinací páření ukazuje na dědičnou predispozici k maligní transformaci. Je diskutováno využití pokusné skupiny zvířat jako modelu pro další studie a léčbu lidského maligního melanomu naší dříve vyvinutou ischemizační technikou.

maligní melanom; melanoblastom; miniaturní prase

Frekvence výskytu maligního melanomu u člověka byla udávána kolem pěti případů ze 100 000, ale podle posledních údajů z některých států USA vykazuje dvojnásobný nárůst (R e i n t g e n aj., 1992). Nebezpečnost tohoto nádoru spočívá ve vysokém množství regionálně a systémově rozsetých metastáz. Procento pacientů s mnohočetnými primárními nádory se uvádí od 1,3 do 5,3 a většina z nich (63–79 %) má více než dvě primární ložiska. Asi u 10 % pacientů byl prokázán familiární výskyt a téměř jedna třetina z nich je postižena multiplicitou primárních nádorů (S l i n g l u f f aj., 1993). Běžné způsoby chemoterapie a radioterapie jsou málo účinné a metody imunologické intervence (zvláště adoptivní imunoterapie) jsou teprve v počátcích (F i n e , 1992). Radikální chirurgické postupy proto zůstávají jako hlavní léčebná cesta. S ohledem na metastázy ve vnitřních orgánech a zejména v regionálních a pararegionálních lymfatických uzlinách je však úspěšnost chirurgického zákroku problematická (S c o t t a M c K a y , 1993). Z tohoto důvodu má vytvoření zvířecího modelu neocenitelný význam při hledání účinných léčebných postupů.

Existence vrozeného maligního melanomu u prasat byla popsána již před půl stoletím (N o r d b y , 1933), ale jeho intenzivnější studium začalo probíhat teprve před 20 roky, a to především díky výskytu hereditární formy u laboratorních miniaturních prasat kmene Sinclair (M i l l i k a n aj., 1974; H o o k aj., 1982;

T i s s o t a j., 1987). Tato forma tumoru u prasat byla propagována jako živočišný model pro lidské maligní melanomy (H o o k a j., 1982), z dostupné literatury jsme však nezjistili, že by byl využit ve studiu terapeutických postupů. V tomto směru může být užitečné naše stádo miniaturních prasat s výskytem maligního melanomu. Jeho základní charakteristiky předkládáme v tomto příspěvku. U skupiny zvířat jsme navíc zaznamenali příznivé účinky léčby cestou ischemizace (devitalizace) primárních nádorů.

MATERIÁL A METODY

Miniaturní laboratorní prasata, u kterých jsme zjistili maligní melanom, jsou chována v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově. Původně pochází z šedočerných až černě pigmentovaných prasat kmene Minnesota, která byla v uplynulých 25 letech různě křížena s prasaty jiných plemen (cornwall, landrase, vietnamské prase). Nádor se vyskytoval u potomků obou pohlaví v několika opakovaných vrzích, ale jen z páření jednoho kance a tří prasníc, přičemž u těchto rodičů nádor pozorován nebyl. V rodokmenu této skupiny prasat byl zaznamenán v několika případech inbreeding. V době přípravy této publikace dvě dlouhodobě sledovaná a léčená zvířata obou pohlaví bez jakýchkoliv recidiv nemoci zplodila potomstvo, u kterého vykazoval výskyt melanoblastomu při narození zvýšenou frekvencí. V jiných kombinacích páření pigmentové névy ani tumory nebyly nalezeny. Tyto skutečnosti svědčí pro autosomálně recesivní způsob dědičnosti predispozice k výskytu nádoru. Další pozorování ukazují na velmi variabilní expresivitu znaku s neznámým stupněm penetrance (připravováno pro publikaci).

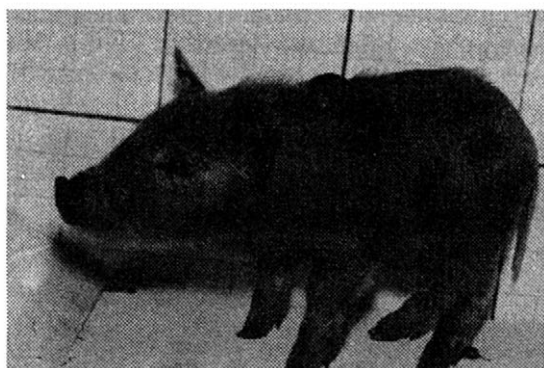
Prasata byla sledována od narození, ale z prostorových a ekonomických důvodů jich mohla být do dospělosti uchována jen část. Podrobně bylo studováno až do pohlavní dospělosti 16 zvířat (hmotnost kolem 15–25 kg) s výrazně utvářenými nádory tubero-nodulární formy na kůži, u nichž jsme provedli probatorní laparotomie a odběry vzorků pro histologické vyšetření metastáz. 14 zvířat bylo navíc podrobeno léčbě kožních nádorů pomocí jejich ischemizace; dvě zvířata byla ponechána neléčená jako kontroly. Pro histologická vyšetření byly parafinové a kryostatové řezy barveny podle Masson-Fontana a Gömöryho (P e a r s e , 1953) nebo hematoxylin-eosinem.

VÝSLEDKY

MAKROSKOPICKÉ POZOROVÁNÍ

U 16 sledovaných zvířat jsme zaznamenali celkem 131 kožních tumorů charakteru maligního melanomu. Tyto nádory byly tubero-nodulární formy (*melano-*

ma nodulare) a tvořily hrbolovitý útvar většinou silně prominující nad povrch okolí kůže (obr. 1). Zasahovaly do koria a hluboko do podkoží až ke svalové fascii. Obvykle byly mnohočetné v počtu od 2 do 15 na jednom zvířeti, kromě jednoho jedince, který měl pouze soliterní nádor tohoto tvaru. U všech těchto zvířat byly pozorovány navíc povrchově se šířící formy (*melanoma superficiale*, *lentigo maligna melanoma*) s velmi variabilními tvary, rozměry a lokalizací jež nedovolují vyhodnocení a zobecnění pro celou skupinu. Z celkového počtu 131 tubero-nodulárních forem bylo sedm lokalizováno na hlavě a krku, 30 na končetinách a 94 na trupu. U všech 16 zvířat s primárními kožními nádory byly zaznamenány rozsáhlé metastázy v regionálních lymfatických uzlinách (*lnn. cervicales* a *lnn. inguinales* 9x, *lnn. illici* 3x), na játrech (11x) a na slezině (12x). Ojedinelé metastázy byly pozorovány na ledvině (1x), na tenkém (4x) a tlustém střevě (2x) a na žaludku (1x).



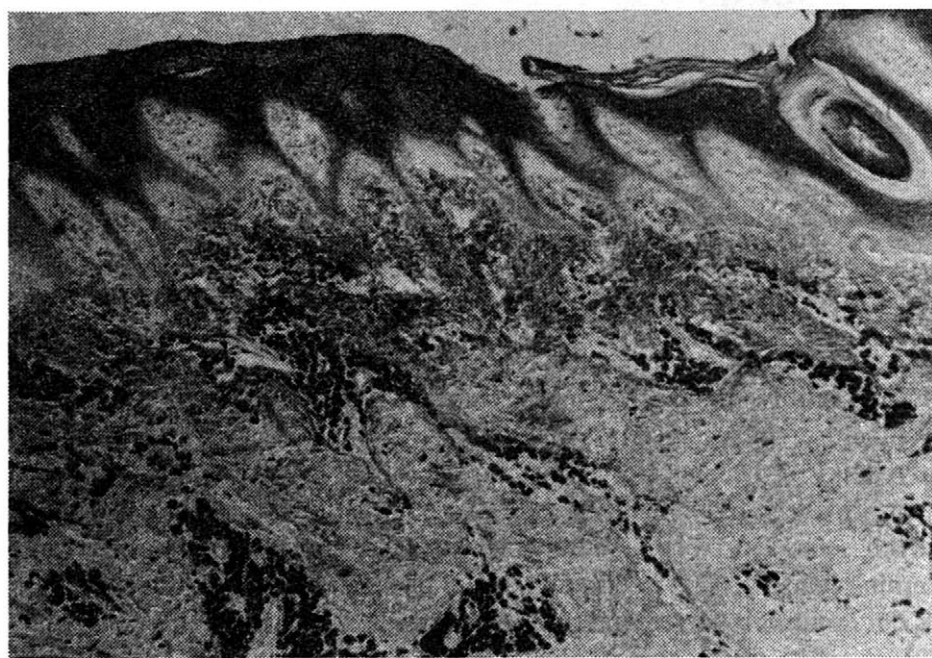
1. Miniaturní prase (věk 1 měsíc) s tubero-nodulární formou melanoblastomu – A miniature pig (age of 1 month) with a tuberous nodular form of melanoblastoma

Maligní melanomové změny byly obvykle patrné na kůži selat od věku dvou měsíců a s přibývajícím věkem docházelo k jejich výraznému zvětšování. Rozměry tubero-nodulárních forem byly velmi variabilní. U dospělých prasat dosahovaly délky 4–12 cm, šířky 3–7 cm, s prominencí nad povrch 2–5 cm. Ve čtyřech případech byly zaznamenány 1,5–2 cm velké tumory na kůži již u novorozených selat. Rozměry a rozsah metastáz byly rovněž velmi variabilní – od soliterních ložisek (GIT) po silné rozšíření na slezině a játrech. Největší metastáza (8 cm dlouhá) byla zjištěna na *lnn. inguinalis superficialis sin.*

HISTOLOGICKÉ NÁLEZY

Na vzorcích kůže odebraných z melanoblastomů byly pozorovány široké pruhy nádorových buněk zasahující od bazální membrány hluboko do retikulární vrstvy koria. Tvořily je hustě nakupené formace melanoblastů obsahující značné

množství melaninu v podobě bohatého nakupení pigmentu v granulární formě. Místy byly uspořádány v trabekulárních nebo i alveolárních formacích. Zasahovaly směrem do hloubi až k *tela subcutanea*, kde byly disperzně lokalizované melanoblastomové buňky dosahující až k úrovni fascie. Směrem k povrchu byla epidermis značně změněná. Tvořilo ji několik řad epidermálních buněk se zachovanými jádry. Na povrchu byla deskvamující se epidermis. Melanoblasty byly okrouhlé nebo polygonální, v některých místech vytvářely husté pruhy. Jejich jádra byla různé velikosti a tvaru, se zřetelnými nukleoly. Jaderný chromatin byl většinou vláknitý. Místy bylo možné pozorovat protáhlá projasnění mezi jednotlivými nádorovými buňkami jako projev disjunkce, která je charakteristická pro melanoblastom. Koriální papily byly zúžené a zašpičatělé, hustěji nakupené v místech maximálního vyklenutí nádoru. Melanoblasty zde byly uspořádány ve shlucích a rovněž disperzně. Nápadnější polynukleární ani kulatobuněčné infiltráty jsme nepozorovali. Lze konstatovat, že v místě tumoru došlo k podstatné desintegraci epidermis (při exofytickém růstu). Směrem do postranních částí tumoru se vracela normální podoba papilární vrstvy (koria). Fascikulární a retikulární uspořádání kolenního vaziva bylo charakteristické pro koriální vrstvu (obr. 2).



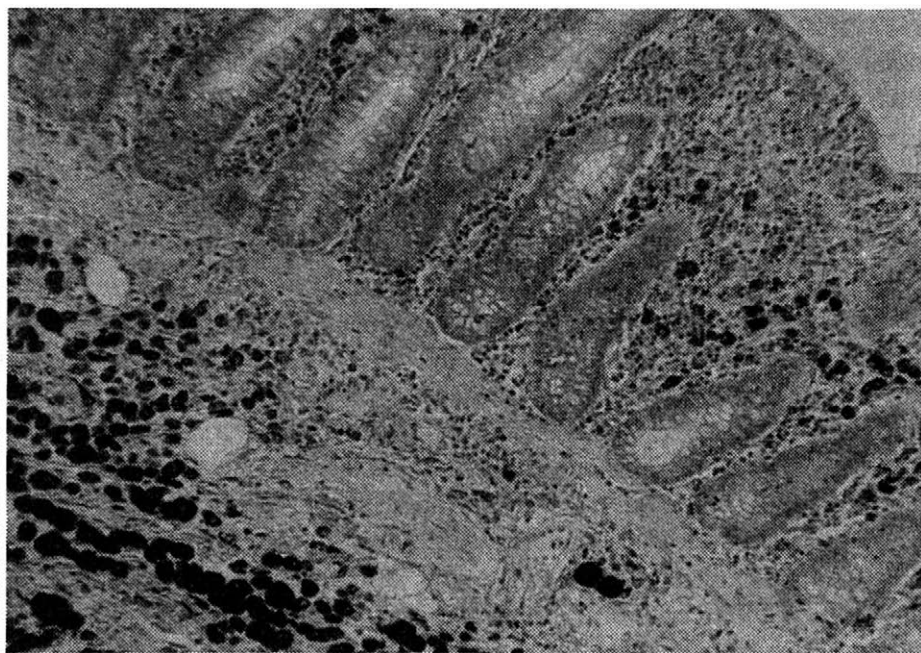
2. Kožní melanoblastom: disperzní a pruhovité infiltráty melanoblastů v retikulární vrstvě koria a podkožní; zv. 20x – Cutaneous melanoblastoma: dispersion and striped infiltrates of melanoblasts in the corium reticular layer and in the subcutaneous layer; magn. 20x

U sleziny bylo nalezeno ložisko melanoblastomových buněk v oblasti *capsula fibrosa*. Subkapsulárně zasahovaly shluky melanoblastů do pulpy a dále centrálně bylo možno pozorovat disperzně rozptýlené nádorové buňky.

Játra byla zasažena hustým rozsevem metastáz melanoblastomu. Subkapsulárně uložené metastázy tvořily hustá seskupení nádorových buněk většinou kulatých nebo oválných s bledými jádry a zřetelnými nukleoly. Ze subkapsulárně uložených metastatických ložisek se disperzně šířily melanoblasty ojedinelé nebo v menších skupinách až do portobiliárních prostorů a mezi jaterní lobuly.

U ledviny pozorovaná metastáza byla v blízkosti kaudálního pólu. Ze subkapsulárního prostoru se pruhy nádorových buněk šířily peritubulárně v korové vrstvě ledviny, kde se pozvolna ztrácely v pojivu.

Uzliny z regionálních skupin (cervikální i inguinální) byly ve značném rozsahu hustě infiltrovány melanoblasty v dřevňové i korové vrstvě až do oblasti hilu. Tento nález sankcionoval velkou metastatickou schopnost primárních melanoblastomových ložisek na kůži. U mesenterických uzlin, uzlin v *mesocolon* a v *lig. hepatoduodenale* (*lymphonodi hepatici*) byly infiltráty melanoblastomových buněk řidší a byly uloženy převážně v subkapsulární zóně uzlin.



3. Metastáza kožního melanoblastomu na tlustém střevě: disperzní infiltrace lamina propria mucosae a husté až pruhovité nahromadění melanoblastů v submukose; zv. 30x – Metastasis of cutaneous melanoblastoma in the large intestine: dispersion infiltration of lamina propria mucosae and dense melanoblastoma accumulation in the submucosa; magn. 30x

Metastatická ložiska na žaludku, tenkém i tlustém střevu (obr. 3) obsahovala husté shluky nádorových buněk v alveolárním uspořádání. Směrem do periferie od metastatických ložisek byly disperzně uloženy melanoblasty většinou okrouhlého až polygonálního tvaru s bledými jádry, vláknitým chromatinem a zřetelnými nukleoly.

DISKUSE

Maligní melanom u člověka nemá v populaci vysokou četnost, ale pro jeho zhoubnost si zaslouhuje prvořadou pozornost. Současné existují poměrně dobré diagnostické metody umožňující rozpoznat jeho malignitu. Rizikové faktory a způsoby léčby jsou stále nedořešené. Zvýšené působení UV záření v důsledku zeslabení ozonové vrstvy v posledních letech určitě není jediným rizikovým faktorem (M u n z a r o v á, 1991). Tomu nasvědčují i naše pozorování. Výskyt tumoru byl zaznamenán u čtyř novorozenců selat a kromě toho všechna pokusná zvířata jsou trvale držena ve stáji bez přímého kontaktu se slunečním zářením. Výskyt tohoto tumoru nebo predispozice k maligní transformaci má u našich zvířat jasně hereditární charakter. Nádor se vyskytuje u některých potomků ze tří několikrát po sobě opakovaných páření. Tento fakt ukazuje, že by mohlo jít o podobný stav zaznamenaný v lidské onkologii, kde asi 10 % multiplicitních kožních melanomů má familiární výskyt (G r e e n e a F r a u m e n i, 1979; S l i n g l u f f aj., 1993). Z nejnovějších poznatků molekulární genetiky člověka vyplývá, že může jít o ztrátu funkce tzv. tumor-supresorového genu. Jeho mutace dává vznik malignímu melanomu. Gen je lokalizován na 9. chromozomu (C a n n o u - A l b r i g h t aj., 1992). Podobnost mezi námi pozorovaným dědičně podmíněným nádorem u prasat a hereditární formou lidského maligního melanomu je za nynějšího stavu znalostí jen spekulativní. Důkazy pro jasné homologie lze získat izolací a klonováním zodpovědného genu u prasat a srovnáním jeho DNA sekvence s lidským genem. Tato cesta je však mimo naše současné možnosti. Schůdnější se jeví použití tzv. „imunofenotypizace“ melanomových buněk (B i s h o p aj., 1993). Podstatou bude porovnání reaktivity protilátek (většinou monoklonálních) reagujících s membránově specifickými a cytoskeletálními antigeny melanomů člověka a prasete. Homologie v xenogenní reaktivitě by naznačily evoluční konzervaci detekovaných struktur a takto i příbuznost tumorigeneze melanomu u obou živočišných druhů. Ať už diskutovaná srovnání dopadnou jakkoliv, z hlediska zatím získaných charakteristik prasečího typu můžeme uvažovat, že u tohoto taxonu jde o zvláštní nosologickou jednotku. Stupeň propagace nádoru, mnohočetnost primárních ložisek tubero-nodulární formy a dědičný charakter opravňují k označení tohoto patologického stavu jako „melanoblastomová nemoc prasat“.

U 14 postižených jedinců jsme zaznamenali po relativně jednoduchém chirurgickém zákroku úspěšnou léčbu tohoto onemocnění. Po ošetření primárního kožního nádoru technikou ischemizace (devitalizace) došlo u všech sledovaných prasat k jejich úplnému vyléčení včetně vymizení metastáz. Dvě kontrolní neléčená prasata uhynula. Při jejich pitvě byly zjištěny rozsáhlé metastázy především ve slezině, játrech, plicích a gastrointestinálním traktu. I přes malý počet kontrol tato skutečnost neodpovídá běžným nálezům u prasat Sinclair, kde průběh nemoci nemusí mít vždy fatální následky a kde byla pozorována spontánní regrese nádoru končící někdy rozsáhlou depigmentací kůže a srsti (Millikan aj., 1974). Proces spontánní regrese u prasat Sinclair byl dlouhodobý, kdežto v našich pokusech je pravidelně navozen procesem ischemizace primárního nádoru, a to s odezvou i na metastázy. Dosažené výsledky jsou publikovány v další práci (Fortýn aj., 1994) a zahrnují podrobnosti devitalizační techniky a její účinky. Domníváme se, že uvedený léčebný postup by mohl přinést obdobné pozitivní výsledky i při léčbě maligního melanomu u lidí.

Poděkování

Autoři děkují pobočce České pojišťovny, a. s. v Mělníku za finanční pomoc, která byla použita na úhradu části nákladů spojených s chovem laboratorních prasat a na nákup chirurgického materiálu. Rovněž děkují paní M. Hořeně za technickou spolupráci.

Literatura

- BISHOP, P. W. – MENASCE, L. P. – YATES, A. J. – WIN, N. A. – BANERJEE, S. S.: An immunophenotypic survey of malignant melanomas. *Histopathology*, 23, 1993: 159–166.
- CANNON-ALBRIGHT, L. A. – GOLDAR, D. E. – MAYER, L. J. – LEWIS, C. M. – ANDERSON, D. E. – FOUNTAIN, J. W. – HEGI, M. E. – WISEMAN, R. W. – PETTY, E. M. – BALE, A. E. aj.: Assignment of a locus for familial melanoma, MCM, to chromosome 9 p 13 - p 22. *Science*, 258, 1992: 1148–1152.
- FINE, L. G. (ed.): Malignant melanoma. Report of a meeting of physicians and scientists: University College London Medical School. *Lancet*, 340, 1992: 948–951.
- FORTÝN, K. – HRUBAN, V. – HORÁK, V. – TICHÝ, J.: Experimentální léčba zhoubného melanomu pomocí ischemizace (devitalizace). *Klin. Onkol.*, 1994 (v tisku).
- GREENE, M. H. – FRAUMENI, J. F.: Hereditary variant of malignant melanoma. New York, Grune and Stratton 1979.
- HOOKE, R. R. – BERKELHAMMER, J. – OXENHANDLER, R. W.: Animal model of human disease. *Melanoma. Amer. J. Pathol.*, 108, 1982: 130–133.
- MILLIKAN, L. E. – BOYLON, J. L. – HOOKE, R. R. – MANNING, P. J.: Melanoma in Sinclair swine: a new animal model. *J. Invest. Dermatol.*, 62, 1974: 20–30.
- MUNZAROVÁ, M.: Ultrafialové záření, pigmentace a maligní melanom. *Klin. Onkol.*, 4, 1991: 99–101.
- NORDBY, J. E.: Congenital melanotic skin tumors in swine. *J. Hered.*, 24, 1933: 361–364.

- PEARSE, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and applied. London, Churchill 1953.
- REINTGEN, D. – CRUSE, C. W. – WELLS, K. – STANKARD, C. – SABA, H. – SCHROER, K. – COX, C. – BERMAN, C. – GLASS, F. – ALVAREZ, L. – BROZENA, S. – FENSKE, N. – FABRI, P. J.: The effectiveness of skin cancer screening and continuing medical education programs toward increasing the survival of patients with malignant melanoma. *Surg. Oncol.*, 1, 1992: 379–384.
- SCOTT, R. N. – MCKAY, A. J.: Elective lymph node dissection in the management of malignant melanoma. *Brit. J. Surg.*, 80, 1993: 284–288.
- SLINGLUFF, C. L. – VOLLMER, R. T. – SEIGLER, H. F.: Multiple primary melanoma: incidence and risk factors in 283 patients. *Surgery*, 113, 1993: 330–339.
- TISSOT, R. G. – BEATTIE, C. W. – AMOSS, M. S.: Inheritance of Sinclair swine cutaneous malignant melanoma. *Canc. Res.*, 47, 1987: 5542–5545.

Došlo 22. 3. 1994

FORTÝN, K. – HRUBAN, V. – HORÁK, V. – HRADECKÝ, J. – TICHÝ, J. (Department of Surgery, Semily Hospital; Department of Animal Breeding and Genetics, University of Agriculture, Prague; Institute of Animal Physiology and Genetics, Liběchov; Department of Pathology and Anatomy, Turnov Hospital):

Melanoblastoma disease in laboratory minipigs: a model for study of human malignant melanomas.

Vet. Med. - Czech, 39, 1994 (10): 597–604.

Human malignant melanoma is a progressively growing tumour mostly with a fatal prognosis during short time. Its frequency has doubled in some states of the USA during the last few years. Surgical treatment, which is still generally used, has very low efficiency due to the numerous metastases in different organs. An animal model is a necessary prerequisite to develop a new therapy method.

We have recorded primary cutaneous malignant melanomas as well as extensive metastases in the visceral organs in darkly pigmented laboratory minipigs. The primary skin tumours were mostly multiple and they showed a tuberous nodular form. The regular occurrence of tumours in a progeny of three specific mating types suggests the existence of genetic predisposition to malignant transformation. We discuss the use of this animal model for further studies and treatment of human malignant melanoma by our ischemization technique developed previously.

malignant melanoma; melanoblastoma; miniature pig

Contact Address:

RNDr. Vratislav H o r á k, CSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR,
277 21 Liběchov, Czech Republic
Tel. 0206/69 70 24, fax 0206/69 71 86

ZMĚNY HYDRATACE SLEPIČÍCH A KACHNÍCH VAJEC BĚHEM INKUBACE

A. Holub, E. Baranyiová, E. Ponížilová

Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Brno

Během inkubace jsme u 80 vajec kurů, bílých leghornek (LB) a hembšírek (NH) (mezi 1. a 20. dnem) a u 80 vajec pekingských bílých kachen (mezi 1. a 25. dnem) určovali velikost ztrát vody. Z provedených analýz vyplývá: Absolutně obsahují nejméně vody vejce NH, nejvíce vejce kachní. V průběhu inkubace jí absolutně i relativně ubývá; u LB 365, u NH 500 a u kachen 312 mg/den. V první polovině líhnutí jsou vodní ztráty větší. V druhé je zřejmě zčásti kompenzuje voda vznikající z tuků oxidovaných k energetickým účelům; u LB a NH z jedné třetiny, u kachen ještě víc. Od dosud uváděných údajů, jejichž variabilita je obecně pokládána za dosti vysokou, se naše výsledky v některých směrech liší. V průběhu inkubace dochází i k velkým přesunům vody mezi jednotlivými komponentami vajec. Zcela mizí z bílku, který se na začátku líhnutí na jejím obsahu ve vejci podílí asi třemi čtvrtinami. Již během první poloviny inkubace se jí víc než třetina dostává do embrya, plodových obalů a tekutin. V deseti následujících dnech se zvlášť prudce hromadí v těle rychle se vyvíjejícího a rostoucího embrya; u kura se v něm její množství zvyšuje osmkrát, u kachen sedmkrát. Ztráty vody i její přesuny vykazují nejen rozdíly mezidruhové, související i s nesterjně dlouhou dobou líhnutí, ale i vnitrodruhové, mezi LB a NH.

líhnutí; úbytek vody; rozdíly mezidruhové a vnitrodruhové (LB a NH)

Kvantitativně nejvýznamnější komponentou ptačích vajec je voda. Její podíl dosahuje dvou třetin hmotnosti (F r e e m a n a V i n c e, 1974). U kurů, krůt a perliček se pohybuje kolem 73 %, u kachen a hus okolo 70 % (R o m a n o f f a R o m a n o f f, 1949). Její koncentrace je zrcadlovým obrazem energetické denzity vajec, jež je u *Galliformes*, *Anseriformes* a některých ratitů vyšší než u ptáků ostatních (C a r e y aj., 1980; W i l l i a m s aj., 1982; B u c h e r, 1987; S o t h e r l a n d a R a h n, 1987). Byl vysloven názor, že vyšší zvodnění vajec může u altriciálů pomáhat vyrovnávání velkých vodních ztrát holátek, která nejsou po vylíhnutí s to opouštět hnízda a hydratovat se z vnějších zdrojů (V l e c k a V l e c k, 1987).

Vody během líhnutí ve vejcích ubývá. V důsledku toho ztrácejí na hmotnosti kolem 12 % (R o m a n o f f, 1929; A r a R a h n, 1980; T u l l e t, 1981,

1990; Meir aj., 1984; Christensen a Bagley, 1987; Hulet aj., 1987; Ar, 1991; Packard a Packard, 1993). Proměnlivost tohoto úbytku je však dosti vysoká (Andersen a Steen, 1986; Packard a Packard, 1993). U kurů jeho variační koeficient dosahuje 15 až 20 % (Tullet, 1990), i 22 % (Visschedijk aj., 1985), u kachen 18 (Hoyt aj., 1979) až 29 % (French a Board, 1983).

Jedinou cestou výdeje vody je v prvních dnech inkubace odpařování. Závisí na vlhkosti vzduchu v hnízdech nebo inkubátorech, ale také na prostupnosti vaječné skořápky pro vodní páry; ta je výsledkem selekce na specifické prostředí hnízd jednotlivých ptačích species (Bond aj., 1988); např. skořápka slepičích vajec má až 17 000 pórů (Wangensteen aj., 1970/71). O tomto dění referovala již řada autorů (Ar aj., 1974; Freeman a Vince, 1974; Rahn a Ar, 1974; Rahn aj., 1974; Vleck aj., 1980; Andersen a Steen, 1986; Visschedijk, 1991), ale některým jeho aspektům nebyla dosud ani u domestikovaných druhů věnována žádoucí pozornost.

Proto jsme se pokusili dosavadní data doplnit a uvést je do nových souvislostí.

MATERIÁL A METODY

Údaje o kurech bílých leghornkách (LB) i hempšírkách (NH) pocházejí z vajec – vždy po osmi kusech – v 1., 3., 11., 15. a 20. dni líhnutí (Wu, 1964). V prvním týdnu byla inkubována v teplotě 38,0–38,5 °C, v druhém 38,5–39,0 °C a ve třetím 39,0–39,5 °C při relativní vlhkosti od 60 do 70 %. V osmihodinových intervalech byla obracena; 7. a 15. den byla kontrolována prosvícením. Za účelem určení hydratace byla vážena, skořápky s podskořápkovými blanami, bílky, žloutky, embrya a jejich zárodečné obaly s embryonálními tekutinami byly od sebe odděleny. Poté byly jejich jednotlivé komponenty zváženy a při teplotě 90–105 °C sušeny. Jejich zvodnění bylo stanoveno z rozdílu jejich mokré a suché hmotnosti.

V experimentech s kachnami (pekinské bílé) jsme 1., 15., 20. a 25. den líhnutí analyzovali po dvaceti vejcích, která byla inkubována v teplotě 37,5 °C (do 19. dne) a 37,0 °C (do 25. dne), vždy při relativní vlhkosti od 60 do 70 %; 8. a 16. den byla kontrolována prosvícením. Jinak, a to i při stanovení hydratace, jsme postupovali obdobně jako u kurů (Ponížilová, 1970).

Výsledky pokusů byly hodnoceny Studentovým *t*-testem.

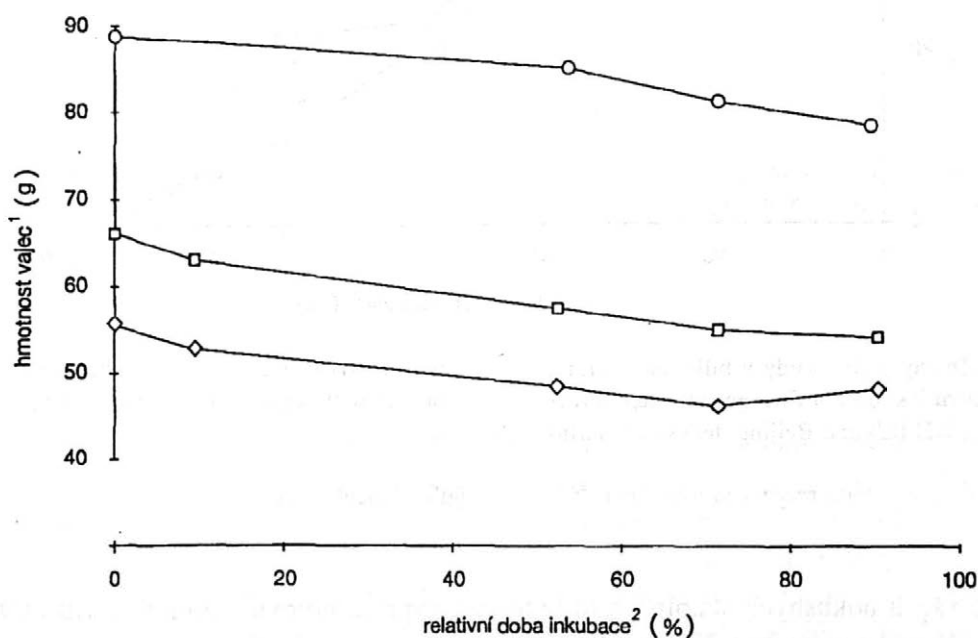
VÝSLEDKY

Nejvýznamnější hmotnostní komponentou vajec byla voda (tab. I). Na začátku inkubace se na jejich hmotnosti podílela asi dvěma třetinami; nejvíce u NH –

I. Změny množství vody ve vejcích LB, NH a pekingských kachen v průběhu inkubace (g) – Changes in water content in the eggs of White Leghorn (LB), New Hampshire (NH) and Beijing ducks during incubation (g)

Doba inkubace (dny) ¹	LB	NH	Kachny ²
1	37,8 ± 0,7	45,1 ± 0,1	58,0 ± 1,6
3	34,7 ± 1,1	42,0 ± 0,4	–
11	31,1 ± 1,2	37,6 ± 2,0	–
15	28,8 ± 2,1	35,6 ± 2,2	52,4 ± 0,8
20	30,5 ± 2,1	35,1 ± 2,9	50,4 ± 0,9
25	–	–	50,2 ± 1,3

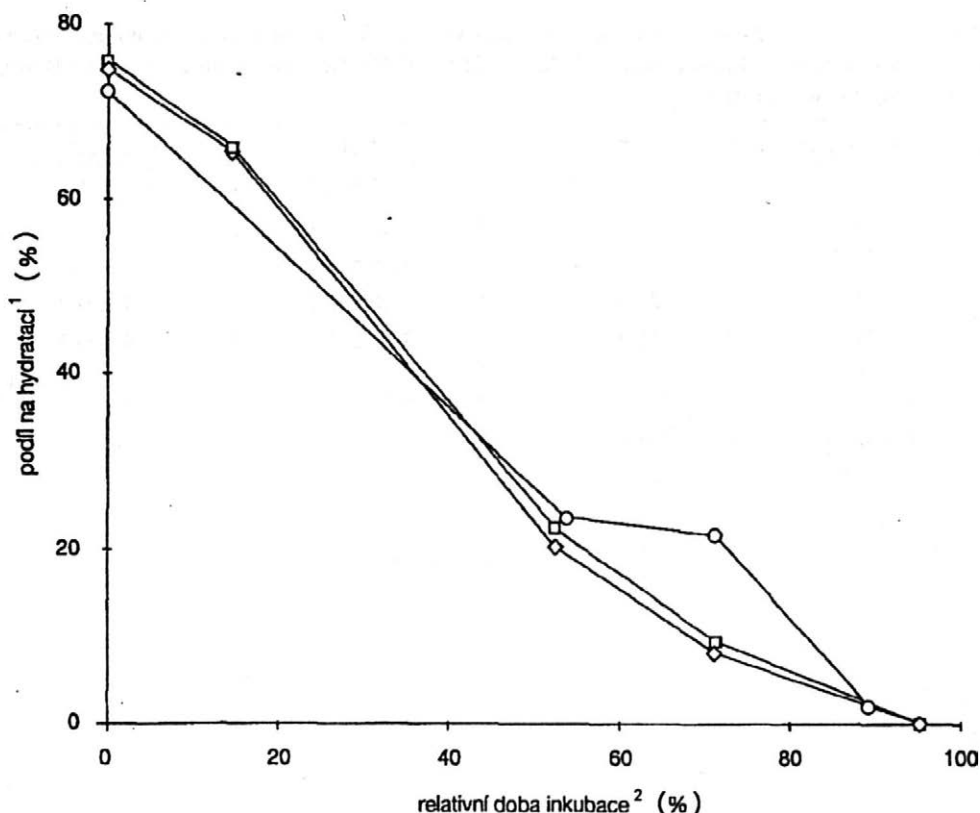
¹length of incubation (days), ²ducks



I. Změny hmotnosti vajec LB (◇), NH (□) a pekingských kachen (○) během inkubace – Changes in egg weight in LB (◇), NH (□) and Beijing ducks (○) during incubation

¹egg weight, ²relative length of incubation

68,2, u LB 67,9 a u kachen 65,3 %. V první polovině líhnutí však tento podíl jevil klesající tendenci, takže u LB obnášel 11. den jen 63,9 a u NH 65,4 %, u kachen 15. den 61,5 %. U LB jí tudíž za 20 dnů ubylo 7,3 g, u NH 10,0 g a u kachen za 25 dnů 7,8 g; tedy 365 (LB), 500 (NH) a 312 mg/den (kachny).



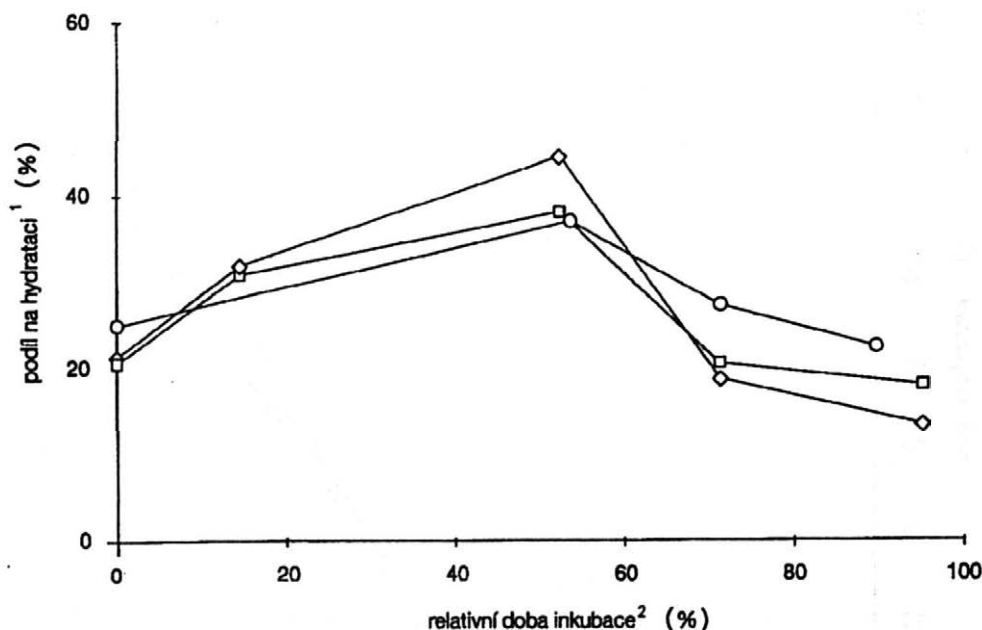
2. Změny podílu vody v bílku na hydrataci vajec LB (◇), NH (□) a pekingských kachen (○) během inkubace – Changes in water percentage in albumen with respect to egg hydration in LB (◇), NH (□) and Beijing ducks (○) during incubation

¹percentage with respect to hydration, ²relative length of incubation

Ve všech pokusných skupinách to bylo více v první polovině líhnutí, u LB 609, u NH 682 a u kachen 373 mg/den.

Tyto inkubační ztráty vody se promítaly do změn hmotnosti vajec. Za 20 dnů líhnutí se snížila o 7,2 g (LB), případně o 11,9 g (NH) a za 25 dnů o 10,2 g (kachny), tedy u LB o 360, u NH o 595 a u kachen o 408 mg/den (obr. 1); zmenšila se tedy u LB o 13,1, u NH o 15,1 a u kachen o 8,8 %, tedy průměrně o 0,66 (LB), 0,76 (NH) a 0,35 %/den (kachny). Převážná část těchto hmotnostních ztrát připadala u obou typů kurů na první polovinu líhnutí. U kachen tomu bylo opačně, ztráty byly větší až v polovině druhé.

V průběhu inkubace vody ve vejcích nejen ubývalo, ale navíc se přemisťovala. Na začátku jí bylo nejvíce v bílku. U LB a NH to byly celé tři čtvrtiny veškeré vaječné vody; u kachen jen o málo méně (obr. 2). S přibývajícím časem však

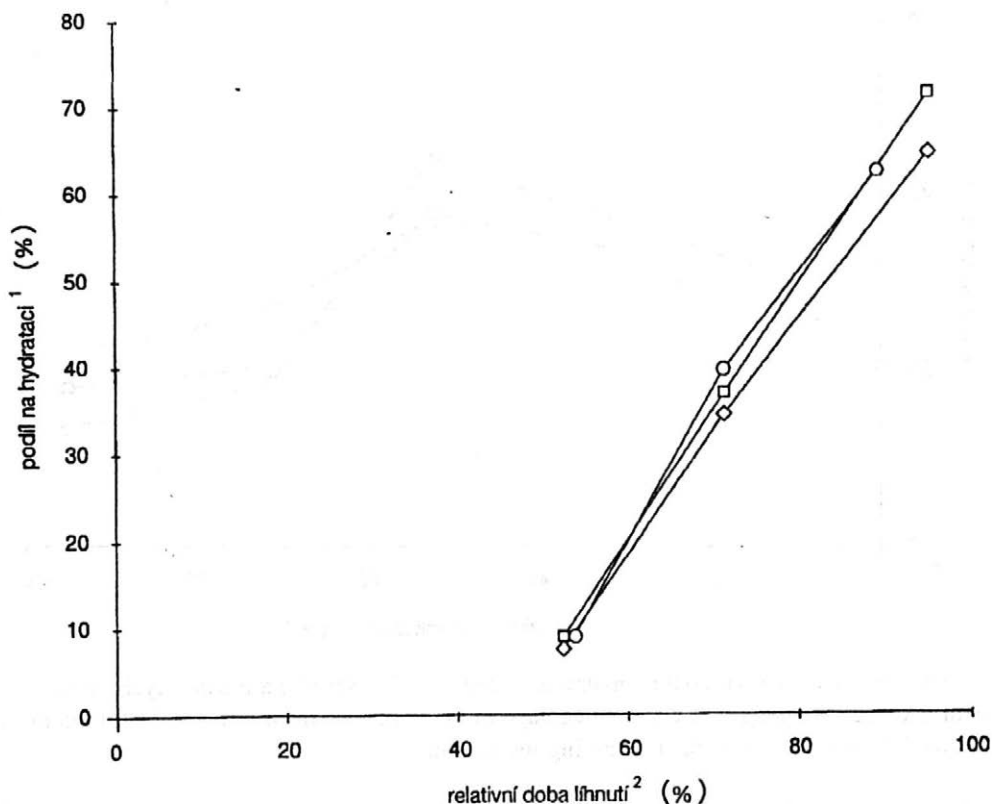


3. Změny podílu vody v žloutku na hydrataci vajec LB (◇), NH (□) a pekingských kachen (○) během inkubace – Changes in water percentage in the yolk with respect to egg hydration in LB (◇), NH (□) and Beijing ducks (○) during incubation

¹percentage with respect to hydration, ²relative length of incubation

z něho prudce, téměř lineárně mizela. Proto se zmenšoval i albuminový volum, a to tak, že se posléze změnil v úzké pole obdané *chorioallantois*. V kachním žloutku byla zprvu obsažena z veškeré vaječné vody jen čtvrtina; u LB a NH to bylo ještě méně, pouhá pětina (obr. 3). Během první poloviny inkubace však vitelinní hydratace, na rozdíl od bílku stoupala na víc než třetinu. Poté se však snižovala také; u LB o víc než polovinu, u NH ještě prudčeji, o dvě třetiny; u kachen méně, o něco přes třetinu. Skořápka a podskořápková blána obsahovala nevelké, relativně neproměnné množství vody. To však inkubační přesuny vody příliš neovlivňovalo.

Již během první poloviny inkubace se víc než třetina vody přesunula do embryí, jejich plodových obalů a tekutin. V druhé polovině líhnutí byl tento proces ještě intenzivnější, takže to u LB a NH do 20. dne byly již čtyři pětiny a u kachen do 25. dne víc než dvě třetiny. V první polovině inkubace se voda dislokovala především do embryonálních obalů a tekutin (obr. 4). I poté se v nich krátce koncentrovala, ale již jen mírně. Posléze jí zde však rychle ubývalo, protože v této fázi vývoje se prudce akumulovala přímo v tělech embryí; u LB a NH byl její podíl v nich více než osminásobný, u kachen sedminásobný (obr. 5).



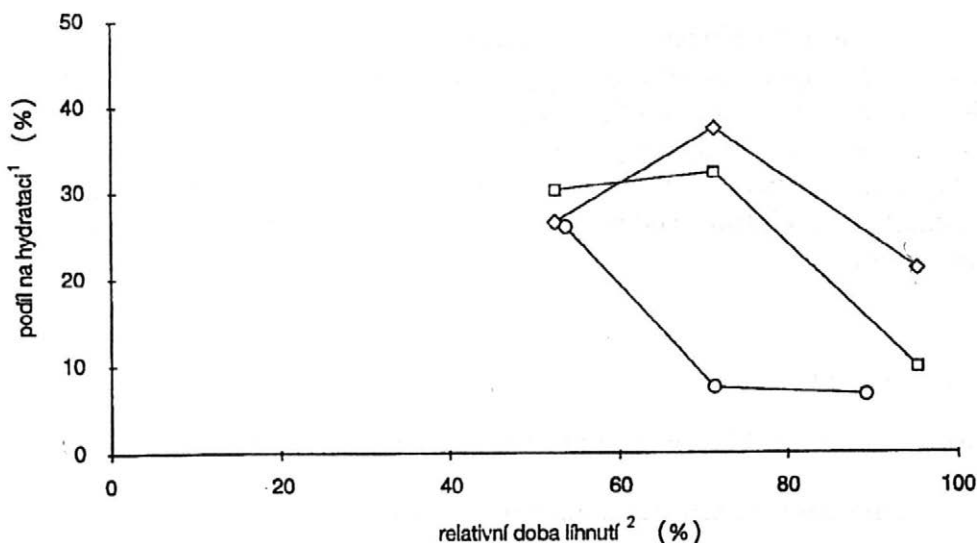
4. Změny podílu fetální vody na hydrataci vajec LB (◇), NH (□) a pekingských kachen (○) během inkubace – Changes in the percentage of fetal fluid with respect to egg hydration in LB (◇), NH (□) and Beijing ducks (○) during incubation

¹percentage with respect to hydration, ²relative length of hatching

DISKUSE

Hydratace vajec má pro náležitý průběh inkubace klíčový význam. Ubývání vody vede ke zvětšování nitrovaječného vzdušného prostoru, v němž zárodek dýchá a před vylíhnutím i pípá. Umožňuje, aby měl stejnou koncentraci vody jako vejce a aby, např. u altriciálů, dosahovala již zmíněných 72 % (A r a R a h n, 1980). Nadměrné ztráty vody by vedly k dehydrataci zárodku a naopak její přebytek by vytvářel riziko, že líhnutý jedinec utone.

Inkubační výdej vody z ptačího vejce se obecně udává na 12,6 % jeho počáteční hmotnosti (Tullet, 1981; Meir aj., 1984; Andersen a Steen, 1986); u kurů tedy na 0,60 %/den (Visschedijk, 1991). Jindy je vyjadřován jako $240 \cdot 10^{-6}$ ml/min/cm² (Wangenstein aj., 1970/71) nebo



5. Změny podílu vody v plodových obalech a tekutinách na hydrataci vajec LB (◇), NH (□) a pekingských kachen (○) během inkubace – Changes in water percentage in the fetal membranes and fluids with respect to egg hydration in LB (◇), NH (□) and Beijing ducks (○) during incubation

¹percentage with respect to hydration, ²relative length of hatching

jako 360 mg/den (Freeman a Vince, 1974) při 51 % relativní vlhkosti a při tlaku vodních par ve výši 3,33 kPa (Visschedijk, 1991). Relativními ztrátami vody zaznamenanými v našich měřeních se předchozím údajům (Visschedijk, 1991) blíží jen LB; u NH jsou vyšší a u kachen naopak značně nižší, ve srovnání s kury zhruba poloviční.

Na rozdíl od proměn látkového a energetického inkubačního metabolismu (Freeman a Vince, 1974; Holub aj., 1991a, b) je ubývání vody během líhnutí téměř neměnné, třebaže v jeho druhé polovině počíná být její pohyb regulován hormony neurohypofýzy (Thommes a McCarter, 1966; Betz, 1967; Lawzewitsch von, 1969; Brasch a Betz, 1971; Woods aj., 1971; Freeman a Vince, 1974). V této inkubační fázi voda totiž vzniká i oxidací tuků, u kurů v množství asi 3 ml (Freeman a Vince, 1974). Voda tohoto původu nepochybně přispívá ke snižování inkubačních vodních ztrát, které jsme zaznamenali i v našich experimentech. Z dat, která jsme publikovali jinde (Holub aj., 1991a, b) totiž vyplývá, že se ke krytí energetických potřeb líhnutí využívá 2,2 (LB), 3,1 (NH) a 2,7 g (kachny) tuků a že tudíž ve vejcích vzniká 2,4 (LB), 3,3 (NH) a 2,9 g (kachny) oxidační vody, a to především v posledních deseti dnech inkubace. To není množství zanedbatelné; hradí 32,9 (LB) a 33,0 (NH) a u kachen dokonce

37,2 % veškerého úbytku vody. Fyzikální povaha evaporace vody v průběhu líhnutí je po započítání oxidační vody do jejího celkového výdeje ještě zřejmější. Do jaké míry tyto skutečnosti, tj. ubývání a přesuny vody souvisejí s náležitou funkcí *chorioallantois* jako plynového výměníku – inkubované embryo se vyvíjí v plynném prostředí (V i s s c h e d i j k , 1987), jehož chemické a fyzikální vlastnosti jsou základní podmínkou vývoje nového ptačího jedince – zasluhuje hlubší studium.

Literatura

- ANDERSEN, O. – STEE, J. B.: Water economy in bird nests. *J. Comp. Physiol. B*, 156, 1986: 823–828.
- AR, A.: Egg water movements during incubation. In: *Avian incubation*. London, 1991: 157–173.
- AR, A. – PAGANELLI, V. V. – REEVES, R. B. – GREENE, D. G. – RAHN, H.: The avian egg: Water vapor conductance, shell thickness, and functional pore area. *Condor*, 76, 1974: 153–158.
- AR, A. – RAHN, H.: Water in the avian egg: Overall budget on incubation. *Amer. Zool.*, 20, 1980: 373–384.
- BETZ, T. W.: The effect of embryonic part distalis grafts on the development of hypophysectomized chick embryos. *Gen. Comp. Endocrin.*, 9, 1967: 172–186.
- BOND, G. M. – BOARD, R. G. – SCOTT, V. D.: A comparative study of changes in the fine structure of avian eggshells during incubation. *Zool. J. Linnean Soc.*, 92, 1988: 105–113.
- BRASCH, M. – BETZ, T. W.: The hormonal activities associated with the cephalic and caudal regions of the cockerels pars distalis. *Gen. Comp. Endocrin.*, 16, 1971: 241–256.
- BUCHER, T. L.: Patterns in the mass-independent energetics of avian development. *J. Exp. Zool.*, Suppl. 1, 1987: 139–150.
- CAREY, C. – RAHN, H. – PARESI, P.: Calories, water, lipid and yolk in avian eggs. *Condor*, 82, 1980: 335–343.
- CHRISTENSEN, V. L. – BAGLEY, L. G.: Water balance in incubating turkey eggs. *Poultry Sci.*, 66, 1987: 1835–1840.
- FREEMAN, B. M. – VINCE, M. A.: *Development of the avian embryo*. London, 1974.
- FRENCH, N. A. – BOARD, R. G.: Water vapour conductance of wildfowl eggs and incubator humidity. *Wildfowl*, 34, 1983: 144–152.
- HOLUB, A. – BARANYIOVÁ, B.: Incubation and postincubation sources of energy in chickens. In: *Sbor. Ref. 24. Mezin. Konf. o fyziologii drůbeže*. Brno, 1991a: 154.
- HOLUB, A. – PONÍŽILOVÁ, E. – BARANYIOVÁ, E.: Incubation and postincubation sources of energy in ducks. In: *Sbor. Ref. 24. Mezin. Konf. o fyziologii drůbeže*. Brno, 1991b: 152.
- HOLUB, A. – PONÍŽILOVÁ, E. – BARANYIOVÁ, E.: Úbytek energie ve vejcích kurů a kačken během inkubace. *Acta Vet. Brno*, v tisku.
- HOYT, D. F. – BOARD, R. G. – RAHN, H. – PAGANELLI, C. V.: The egg of the Anatidae: conductance, pore structure and metabolism. *Physiol. Zool.*, 52, 1979: 438–450.

- HULET, R. M. – CHRISTENSEN, V. L. – BAGLEY, L. G.: Controlled egg weight loss during incubation of turkey eggs. *Poultry Sci.*, 66, 1987: 428–432.
- LAWZEWITSCH, I. von: Development of the neurosecretory hypothalamic-hypophyseal system of the chick embryo as evidenced in the total preparation. *Acta Anat.*, 72, 1969: 83–93.
- MEIR, M. A. – NIR, A. – AR, A.: Increasing hatchability of turkey eggs by hatching incubator humidity to shell conductance of individual eggs. *Poultry Sci.*, 63, 1984: 1489–1496.
- PACKARD, M. J. – PACKARD, G. C.: Water loss from eggs of domestic fowl and calcium status of hatchlings. *J. Comp. Physiol. B*, 163, 1993: 327–331.
- PONÍŽILOVÁ, E.: Chemické a váhové změny inkubovaného kachního vejce a zárodku. [Kandidátská práce.] Brno 1970. 113 s. – Vysoká škola veterinární.
- RAHN, H. – AR, A.: The avian egg: Incubation time and water loss. *Condor*, 76, 1974: 147–152.
- RAHN, H. – PAGANELLI, C. V. – AR, A.: The avian egg: Air-cell gas tension metabolism and incubation time. *Resp. Physiol.*, 22, 1974: 296–309.
- ROMANOFF, A. L.: Effect of humidity on the growth, calcium metabolism and mortality of the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, 54, 1929: 343–348.
- ROMANOFF, A. L. – ROMANOFF, A. J.: The avian egg. New York, 1949.
- SOTHERLAND, P. R. – RAHN, H.: On the composition of bird eggs. *Condor*, 89, 1987: 48–65.
- TULLET, S. G.: Theoretical and practical aspects of eggshell porosity. *Turkeys*, 29, 1981: 24–28.
- TULLET, S. G.: Science and the art of incubation. *Poultry Sci.*, 69, 1990: 1–15.
- THOMMES, R. C. – McCARTER, C. F.: Adenohypophyseal control of water balance in the developing chick embryo. *Amer. Zool.*, 6, 1966: 517.
- VISSCHEDIJK, A. H. J.: Air space: the embryonic medium. *J. Exp. Zool., Suppl.* 1, 1987: 193–201.
- VISSCHEDIJK, A. H. J.: Physics and physiology of incubation. *Brit. Poultry Sci.*, 32, 1991: 3–20.
- VISSCHEDIJK, A. H. J. – TAZAWA, H. – PIIPER, J.: Variability of shell conductance and gas exchange of chicken eggs. *Resp. Physiol.*, 59, 1985: 339–345.
- VLECK, C. M. – VLECK, D.: Metabolism and energetics of avian embryo. *J. Exp. Zool., Suppl.* 1, 1987: 111–125.
- VLECK, C. M. – VLECK, D. – HOYT, D. F.: Patterns of metabolism and growth in avian embryos. *Amer. Zool.*, 20, 1980: 405–416.
- WANGENSTEEN, O. D. – WILSON, D. – RAHN, H.: Diffusion of gases across the shell of the hen's egg. *Resp. Physiol.*, 11, 1970/71: 16–30.
- WILLIAMS, A. J. – SIEGFRIED, W. R. – COOPER, J.: Egg composition and hatchling precocity in seabirds. *Ibis*, 124, 1982: 456–470.
- WOODS, J. E. – DE VRIES, G. W. – THOMMES, R. C.: Ontogenesis of the pituitary-adrenal axis in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrin.*, 17, 1971: 407–415.
- WU AN-KUO: Změny chemického složení vajec a kuřat u plemene bílých leghornek a new-hampshire v inkubačním a postinkubačním údobí. [Kandidátská práce.] Brno 1964. 241 s. – Vysoká škola veterinární.

Došlo 31. 3. 1994

HOLUB, A. – BARANYIOVÁ, E. – PONÍŽILOVÁ, E. (University of Veterinary Medicine and Pharmaceutical Sciences, Brno):

Changes in hydration of fow and duck eggs during incubation.

Vet. Med. – Czech, 39, 1994 (10): 605–614.

Water loss was determined during incubation in 80 eggs of the domestic fowl, White Leghorn – LB and New Hampshire – NH (between the 1st and 20th day), and in 80 eggs of Beijing White ducks (between the 1st and 25th day).

Our data have shown that, the lowest actual water content was found in NH eggs, the highest in the duck eggs. Water content decreased absolutely and relatively during incubation; 365 in LB, 500 in NH and 312 mg/d in ducks. Water loss was higher in the first half of hatching. In the second half it was probably partly offset by water originating from fats oxidized for energetic purposes; the offset made a third in LB and NH, and still more in the ducks. Our results are somewhat different from the literature data, the variability of which is considered to be rather high in general.

There were large shifts of water among the egg components during incubation. Water totally disappeared from the albumen, although it contained approximately three quarters of water was at the beginning of hatching. Already in the first half of incubation, more than a third of water was transported to the embryo, fetal membranes and fluids. In the subsequent ten days, water accumulation in the body of the developing and growing embryo was especially rapid; the water amount increased eight times in the fowl, seven times in the duck bodies.

Water losses and its shifts show not only interspecific differences related to different lengths of incubation, but also intraspecific ones, between LB and NH.

hatching; water loss; interspecific and intraspecific differences (LB and NH)

Contact Address:

MVDr. Eva Baranyiová, CSc., Vysoká škola veterinární a farmaceutická,
Palackého 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic
Tel. 05/41 32 11 07, fax 05/41 21 11 51

EPIZOOTOLOGIE A PATOGENEZE AVIÁRNÍ MYKOBAKTERIÓZY HOLUBA DOMACÍHO (*COLUMBA LIVIA F. DOMESTICA*)

K. Hejlíček¹, F. Tremel²

¹Věda - soukromá veterinární laboratoř, Strakonice

²Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Brno

Byl sledován výskyt a rozšíření aviární mykobakterií u holuba domácího, jeho vnímavost k infekci a epizootologický význam jako zdroje *M. avium*. Bylo vyšetřeno 470 holubů ze sedmi lokalit s různou epizootologickou situací v aviární tuberkulóze. Tuberkulózní změny byly nalezeny u dvou jedinců (0,43 %) a mykobakterie izolovány z pěti jedinců (1,06 %). Z pěti izolovaných kmenů mykobakterií byly čtyři patogenní pro kura domácího. Experimentálními infekcemi byla prokázána vysoká rezistence holuba domácího k *M. avium*. Po intramuskulární infekci suspenzí *M. avium* vznikly histologické změny ve svalu v místě vpichu za 14 dnů, v játrech za 28 dní, v plicích a ve střevě za 56 dnů. Makroskopické změny se vyvinuly pouze v místě vpichu po 21 dnech, v jiných orgánech a tkáních nebyly pozorovány. Mykobakterie byly izolovány od 12. dne po infekci, zejména ze svalu v místě vpichu, z jater, sleziny a kostní dřevě. Po perorální infekci krmivem kontaminovaným játry tuberkulózního kura byly nalezeny po 160 dnech makroskopické změny ve střevě. Mykobakterie z různých orgánů a tkání byly izolovány z holubů usmrčených za 160 dnů. Po kontaktu s tuberkulózním kurem byly zjištěny pouze v jednom případě histologické změny ve stěně střevní po 380 dnech a kultivací prokázány mykobakterie v kostní dřevě holuba uhynulého za 68 dnů.

holub domácí (*Columba livia f. domestica*); aviární mykobakterií; epizootologie; patogeneze

V dřívějších letech byla tuberkulóza holuba domácího (dále jen holub), často se vyskytující onemocnění. Tak např. Eber a Pallaske-Eber (1934) diagnostikovali v letech 1911–1930 tuberkulózní změny u 1,1 % z 2 170 pitvaných holubů. Berge (1929) našel tuberkulózu u 3,8 %, Laenkholm (1938) u 5,6 %, Hillemark (1940) u 4,5 % vyšetřovaných holubů.

V posledních 50 letech však počet pozorovaných případů tuberkulózy holubů klesá. Tak Gylstorf (1960) v letech 1948–1959 našel u pitvaných holubů tuberkulózu pouze v jednom roce, a to v 0,6 %. Podobně Kronberger (1960) uvádí za období 1919–1958 pokles incidence tuberkulózních změn u pitvaných holubů z 2,7 na 0,0 % resp. 0,6 %.

U nás v letech 1971–1973 podle výsledků patologickoanatomických vyšetření SVÚ v ČR byla zjištěna tuberkulóza holubů v 0,39–1,38 % z pitvaných. Podobně i v letech 1986–1989 bylo podle Surveillance antropozoonóz v ČR u holubů ojediněle zjišťováno *M. avium* a nalézány tuberkulózní změny.

I. Výsledky vyšetření na aviární mykobakteriízu holuba domácího (*Columba livia f. domestica*) ulovených v lokalitách s různou epizootologickou charakteristikou v aviární mykobakteriíze – The results of examination for avian mycobacteriosis in the pigeon (*Columba livia f. domestica*) caught at localities with different epizootological characteristics of avian mycobacteriosis

Epizootologická charakteristika lokality ¹	Vyšetřeno jedinců ²	Izolovány mykobakterie (počet/%) ³	Patologickoanatomické změny (počet/%) ⁴
1. Drůbežárny s výskytem tuberkulózy ⁵	6	0	0
2. Drůbežárna bez výskytu tuberkulózy ⁶	2	0	0
3. Stáje skotu s výskytem aviární tuberkulinové alergie ⁷	5	1	0
4. Stáje skotu bez alergických reakcí ⁸	206	0	0
5. Velkokapacitní teletník bez alergických reakcí a výrobní krmiv ⁹	213	4*	2
6. Stáje prasat s výskytem aviární tuberkulinové alergie ¹⁰	11	0	0
7. Lokality v zemědělské oblasti před výstavbou stájí pro skot ¹¹	27	0	0
	470	5/1,06	2/0,42

* – 2x izolace ze změněných orgánů, 2x izolace z trusu – isolation from injured organs in two cases, isolation from droppings in two cases

¹epizootological characteristics of locality, ²birds examined, ³mycobacteria isolated (counts/%), ⁴patho-anatomic lesions (number/%), ⁵poultry farms with tuberculosis occurrence, ⁶poultry farm without occurrence of tuberculosis, ⁷cattle houses with occurrence of avian tuberculin allergy, ⁸cattle houses without allergic reactions, ⁹large-capacity calf-house without allergic reactions and feed-processing plant, ¹⁰pigsties with occurrence of avian tuberculin allergy, ¹¹localities in agricultural region before construction of cattle houses

Předpokládá se, že hlavním zdrojem aviárních mykobakterií pro holuby je tuberkulóza postižená drůbež. Intenzita onemocnění vzrůstá s věkem ptáků (B e r g e , 1929). Holubi sami však také mohou být zdrojem aviárních mykobakterií. F e d o s e j e v a j . (1963) zjistili, že z 16 infikovaných holubů čtyři vylučovali mykobakterie trusem. R ö d e r (1964) referoval o dvou případech vzniku aviární alergie u skotu, který se nakazil od tuberkulózu nemocných holubů.

Infekce holubů nastává nejčastěji zažívací a respirační cestou. Tomu odpovídá i lokalizace tuberkulózních procesů. Tak E b e r (1924) našel u pitvaných holubů tuberkulózní procesy v játrech v 85,7 % a v plicích v 64,3 %, D u m i t r u (1934) pak v 86,4 %, resp. v 62,4 %.

Vnímavost holuba k *M. avium* byla ověřována i různými experimentálními infekcemi. Z výsledků vyplynulo, že holub je značně rezistentní k infekci aviárními mykobakteriemi. Po intramuskulární infekci Cornell a Griffith (1930) pozorovali za 130–177 dnů pouze změny v místě vpichu, i když kultivace z orgánů byla pozitivní. Stejný nález zjistil po aplikaci malého množství mykobakterií i Hepdig (1939). Teprve po zvýšení dávky mykobakterií našel u jednoho holuba poraženého za čtyři měsíce rozsáhlou tuberkulózu střev a u dalšího holuba usmrčeného za pět a půl měsíce miliární tuberkulózu jater a kaseózní změny ve varlatech.

Cílem naší práce bylo přispět k poznání výskytu mykobakterií u holuba domácího v různých epizootologických podmínkách aviární tuberkulózy. Dále pak experimentálními infekcemi objasnit vnímavost holuba k aviárním mykobakteriím, dobu vzniku a lokalizaci tuberkulózních procesů a z toho vyplývající význam holuba jako zdroje aviárních mykobakterií pro další druhy zvířat.

MATERIÁL A METODY

Vyšetřování holubi domácí byli uloveni v prostředí s různou epizootologickou situací v aviární tuberkulóze. Celkem bylo ze sedmi lokalit vyšetřeno 470 holubů (tab. I). Ptáci byli vyšetřeni patologickoanatomicky a mikrobiologicky. Kultivačně byl vyšetřen z každého jedince směsný vzorek jater a sleziny, dále pak obsah střev. U izolovaných kmenů mykobakterií byla ověřována jejich patogenita pro kura domácího (1 mg/kg ž. h.), morče (0,1 mg/kg ž. h.) a alergenogenní vlastnosti.

K experimentálním infekcím byli použiti holubi pocházející z chovů v nichž nebyla tuberkulóza nikdy prokázána.

Při experimentální intramuskulární infekci (*i. m.*) byli holubi infikováni suspenzí *M. avium* sérotyp 2 v dávce 1 mg/kg živé hmotnosti. Kmen mykobakterií použitý pro experimentální infekce byl izolován z tbc jater kura domácího a v dávce 1 mg/kg ž. h. vyvolával u experimentálně infikovaného kura generalizovanou tuberkulózu.

K perorální infekci (*p. o.*) bylo použito krmivo kontaminované tuberkulózně změněnými játry kura domácího (9 dílů krmiva + 1 díl tbc jater). Kmen mykobakterií, který vyvolával tbc změny u kura domácího, byl určen jako *M. avium* sérotyp 2.

V kontaktní infekci byli holubi umístěni do společné voliéry s kurem domácím pocházejícím z chovu infikovaného tuberkulózu. Ptáci reagovali na tuberkulin a v některých případech vykazovali i klinické příznaky onemocnění. Po ukončení pokusu byl kur domácí usmrčen a vyšetřen. Izolované mykobakterie byly typizovány jako *M. avium* sérotyp 2.

Vždy ve dvou pokusech bylo intramuskulárně infikováno 24 holubů, perorálně 17 a v kontaktu bylo 18 holubů. Pokud dříve neuhynuli, byli holubi usmrčeni

1. Výsledky patologickeoanatomického, histologického a kulturačního vyšetření holuba domácího (*C. livia f. domestica*) infikovaného intramuskulárně suspenzí *M. avium* (1 mg/kg ž. h.) – The results of patho anatomic, histologic and bacteriological examination of the pigeon (*C. livia f. domestica*) infected intramuscularly with suspension of *M. avium* (1 mg/kg l.w.)

A

B

12 dnů						
12						
12						
12						
14			N			
14			N			
21						
21						
21						
21						
21						
28					N	
28					N	
35						
35						
35						
35						
35						
42			N			
42						
56					N	
56			N		N	
69						
69						

Sv Ja SI Pl L St

.....		K	K				K		
.....								K	
.....									
.....		K						K	
									
									
	K	K							
			K						
									
									
									
			K					K	
									
								K	
									
									
.....									
									
								K	
									

Sv Ja SI Pl L St PO KD M

A		B	
	beze změn - without changes		negativní - negative
	histologické změny - histological changes		do 20 kolonií - up to 20 colonies
	izolované tbc změny - isolated tuberculous changes		nad 20 kolonií - above 20 colonies
	miliární tbc - miliar tuberculosis		souvislý porost - continuous stand
	nevyšetřeno - unexamined		kontaminace - contamination
	úhyn - mortality		nevyšetřeno - unexamined

Sv = sval – muscle

Ja = játra – liver

Sl = slezina – spleen

Pl = plíce – lungs

L = ledviny – kidneys

A = dynamika vývoje patologickoanatomických a histologických tbc změn – dynamics of development of patho-anatomical and histological tuberculous changes

B = kulturační vyšetření – cultivation examination

St = střevo – intestine

PO = pohlavní orgány – sexual organs

KD = kostní dřeň – bone marrow

M = mozek – brain

dnů – days

postupně a sice při *i. m.* infekci za 12–69 dnů, při *p. o.* infekci za 106–220 dnů a po kontaktu s tuberkulózním kurem za 162–380 dnů.

Po usmrcení byl zjišťován patologickoanatomický nále z jednotlivé orgány a tkáň vyšetřeny kulturačně a histologicky podle stávajících standardních metodik.

VÝSLEDKY

Celkem bylo vyšetřeno 470 holubů v sedmi lokalitách (tab. I). Jak je z tabulky dále patrné, byly z pěti ptáků izolovány mykobakterie a u dvou (0,42 %) prokázány tuberkulózní změny. Kmen mykobakterií izolovaný z holuba v lokalitě č. 3 nebyl v biologickém pokusu patogenní pro kura domácího ani pro morče. Kmeny mykobakterií izolované z holubů s makroskopickými tuberkulózními změnami a trusu holubů bez makroskopických změn v lokalitě 5 byly patogenní pro kura domácího, u kterého vyvolávaly generalizovanou tuberkulózu.

Po *i. m.* infekci 24 holubů (obr. 1) vznikly histologicky zjištělé změny (specifický granulární zánět a přítomnost acidorezistentních bakterií) v prsní svalovině v místě vpichu již po 14 dnech a makroskopicky zjištělé změny (kaseózní ložiska) po 21 dnech. Histologické změny v játrech byly pozorovány za 28 dnů, v plicích a ve střevě po 56 dnech. Z 20 holubů, kteří byli usmrceni za 14 dnů a později jich 13 mělo změny v místě vpichu a 13 z usmrcených za

2. Výsledky patologicckoanatomického, histologického a kulturačního vyšetření holuba domácího (*C. livia f. domestica*) infikovaného perorálně krmivem kontaminovaným játry tbc kura (9 dílů krmiva + 1 díl jater) – The results of patho-anatomic, histologic and bacterial examination of the pigeon (*C. livia f. domestica*) infected perorally with feed contaminated with TBC liver of the domestic fowl (9 parts of feed and 1 part of liver)

	A						B									
	Sv	Ja	Si	Pl	L	St	Sv	Ja	Si	Pl	L	St	PO	KD	M	
+41 dnů							N	N	N	N	N	N	N	N	N	
+68							N	N	N	N	N	N	N	N	N	
+68																
+83							N	N	N	N	N	N	N	N	N	
106																
106																
106																
133																
133																
133																
160			N				////									
160			N			////										
163																
163																
163																
190					N	////										
220																
220						////										

28 dnů a později pouze čtyři měli histologické změny v orgánech a tkáních mimo prsní sval. Makroskopické změny nebyly nalezeny. Mykobakterie byly izolovány již od 12. dne po infekci z různých orgánů a tkání, především pak z místa vpichu v prsní svalovinu, z jater, sleziny a z kostní dřeně.

Po p. o. infekci 17 holubů kontaminovaným krmivem (obr. 2) byly nalezeny po 160 dnech makroskopické tuberkulózní změny (uzlová forma) ve střevě. Z os-

3. Výsledky patologickoanatomického, histologického a kultivačního vyšetření holuba domácího (*C. livia f. domestica*) infikovaného kontaktem s TBC kurem – The results of patho anatomic, histologic and bacterial examination of the pigeon (*C. livia f. domestica*) infected by a contact with the TBC domestic fowl

	A						B								
	Sv	Ja	Sl	Pi	L	St	Sv	Ja	Sl	Pi	L	St	Po	Ko	H
+67 dnů							N	N	N	N	N	N	N	N	N
+68													////		
+103							N	N	N	N	N	N	N	N	N
162											K		K		
162															
162															
180					N										
180			N												
218															
218															
253														K	
253															
253															
253											K				
270			N	N	N										
270															
380			N		N	:::::									
380			N												

mi holubů, kteří byli usmrceni za 160 dnů a později pouze tři měli tuberkulózní změny. Mykobakterie byly izolovány z různých tkání a orgánů pouze u dvou holubů usmrcených za 160 dnů po infekci.

Ke kontaktní infekci s tuberkulózním kurem bylo použito 18 holubů (obr. 3). Pouze v jednom případě byly za 380 dnů nalezeny histologické změny ve střevě a rovněž pouze v jednom případě byly u holuba uhynulého za 68 dnů izolovány mykobakterie z kostní dřeně.

Spolu s experimentálními pokusy byla vytvořena i kontrolní skupina, která byla usmrcena vždy na konci pokusu a vyšetřena s negativním výsledkem.

DISKUSE

Epizootologický význam holuba domácího jako možného zdroje a šířitele původců infekčních chorob je značný. Holub domácí přichází do těsného kontaktu se stájemí hospodářských zvířat, se zvířaty v malých chovech, se sklady a výrobami krmiv atd. Dále pak jsou holubi chováni v malých chovech, kde se vyskytuje mimo jiné i kur domácí, často infikovaný tuberkulózou. Tam lze hledat též hlavní zdroj *M. avium* pro tyto holuby. V našich vyšetřeních jsme ze 470 jedinců našli tuberkulózní změny v orgánech ve dvou případech. Jednalo se o holuby ulovené v areálu velkokapacitního teletníku a výroby krmiv situovaného na okraji města. V areálu se vyskytovalo pravidelně několik set holubů částečně v objektu hnízdicích, avšak většinou přilétajících sem za potravou z chovů těsně sousedícího města. Tedy z malých chovů, kde se vyskytuje i tuberkulózní kur. Izolace dalšího kmene mykobakterií, který však nebyl patogenní pro kura domácího, z holuba uloveného v blízkosti stáje skotu s výskytem aviárních tuberkulinových reakcí ukazuje spíše na zdroj mimo hospodářská zvířata. Jinak výsledky našich šetření potvrzují velmi nízký výskyt tuberkulózních změn i mykobakterií u holuba domácího. Pokud uvážíme, že holubi přicházejí stále do styku s tuberkulózním kurem, svědčí to o jejich značné rezistenci k infekci *M. avium*. Jestliže však tuto skutečnost porovnáváme s nepoměrně vyšším výskytem tuberkulózních nálezů v minulé době, nutno hledat vysvětlení ve změnách v úrovni chovu drůbeže, kdy mezi chovateli existuje určitá povědomost o tuberkulóze drůbeže a z chovu jsou včas vyřazováni jedinci klinicky nemocní a přece jen častěji nastává obměna chovaného kura domácího. To snižuje stupeň kontaminace prostředí malochovů a i riziko infekce. V současné epizootologické situaci nelze tedy pominout holuba domácího jako zdroj aviárních mykobakterií pro ostatní druhy zvířat, avšak vzhledem k nízké incidenci tuberkulózního onemocnění bude jeho význam jako šířitele onemocnění velmi malý.

Experimentálními infekcemi se nám podařilo potvrdit vysokou rezistenci holuba domácího k *M. avium*. V tom se naše poznatky shodují s poznatky autorů Cornell a Griffith (1930) a Hepdig (1939). Také my jsme po infekci obvyklou infekční dávkou (1 mg/kg ž. h.) pozorovali makroskopické změny pouze v místě vpichu. Stejně jako Cornell a Griffith (1930) jsme však izolovali *M. avium* z různých tkání, i když se jednalo většinou o málo intenzivní nárůst. I to svědčí o značné rezistenci holuba domácího k infekci *M. avium*. Některé diskrepance mezi patologickomorfologickými nálezy a kulturačním vyšetřením si vysvětlujeme právě malým počtem mykobakterií přítomných ve tkáních, takže například i při vývinu histologických změn se nepodařilo

mykobakterie zpětně reizolovat. Výsledky H e p d i g a (1939) o výskytu rozsáhlých tuberkulózních změn za delší dobu po intramuskulární infekci jsme nemohli potvrdit, protože jsme infikované ptáky sledovali pouze 69 dnů. Po perorální infekci kontaminovaným krmivem jsme nalézali u všech tří holubů s výskytem makroskopických tuberkulózních změn procesy pouze ve stěně střevní. Z obsahu střev jsme rovněž prokazovali mykobakterie. To svědčí o značné afinitě *M. avium* ke stěně střevní holuba. I když tedy onemocní po přirozeném, perorálním způsobu infekce relativně málo jedinců, mohou ti, u nichž se vyvinou tuberkulózní změny, být nebezpečným zdrojem infekce. Výsledky kontaktních infekcí holubů s tuberkulózním kurem domácím jen potvrdily vysokou rezistenci holuba domácího k *M. avium*, ovšem stejně tak i afinitu *M. avium* ke stěně střevní.

L i t e r a t u r a

- BERGE, R.: Tuberkulose bei Tauben. Dtsch. tierärztl. Wschr., 37, 1929: 68.
- CORNELL, R. L. – GRIFFITH, A. S.: Types of tubercle bacilli in swine tuberculosis. J. Comp. Path. Therap., 43, 1930: 56. In: Dtsch. tierärztl. Wschr., 38, 1930: 735.
- DUMITRU, F.: Beitrag zur klinischen, anatomo-pathologischen und bakteriologischen Diagnose der Tauben-tuberkulose. [Disertace.] Bukarest 1934. 63 s.
- EBER, A.: Die Tuberkulose des Hausgeflügel. Z. Infekt.-krankh., 25, 1924: 145–175. In: FELDMANN, W. H.: Avian tuberculosis infections. 1938: 223–245.
- EBER, A. – PALLASKE-EBER, R.: Die durch Obduktion feststellbaren Geflügelkrankheiten. Hannover, Verlag von M. D. H. Schöper 1934.
- FEDOSEJEV, V. S. – ŽILIN, A. – ACHMEDIEV, G.: I. Pigeons as a source of avian tuberculosis. II. Diagnosis of tuberculosis in pigeons. Trudy Semipalat. Zoovet. Inst., 3, 1963: 252–257; 258–260. In: Vet. Bull., 35, 1965: 420.
- GYLSTORFF, I.: Todesursachenstatistik des Geflügelgesundheitsdienstes Bayern 1948/49 bis 1958/59. Mh. Vet.-Med., 15, 1960: 627–632.
- HEPDIG, L.: Beiträge zur Tuberkulose der Tauben. Arch. Tierheilkde., 74, 1939: 442–453.
- HILLEMARCK, K.: Einige Fälle von Vogeltuberkulose beim Rind. Skand. Vet.-Tidskr., 45, 1940: 1–17. In: Jb. Vet. Med., 67, 1940: 441.
- KRONBERGER, H.: Befunde bei Geflügelsektionen. Mh. Vet.-Med., 15, 1960: 197–202.
- LEANKHOLM, W.: Quoted by Zeller. In: FELDMANN, W. H.: Avian tuberculosis infections. 1938: 223–245.
- RÖDER, K. H.: Geflügeltuberkulose beim Rind – durch Tauben übertragen. Tierärztl. Umsch., 14, 1964: 11.
- Surveillance antropozoonóz. Pardubice, ÚVO 1971–1973.
- Surveillance antropozoonóz. Pardubice, ÚVO 1986–1989.

HEJLÍČEK, K. – TREML, F. (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno):

Epizootology and pathogenesis of avian mycobacteriosis in the pigeon (*Columba livia* f. *domestica*).

Vet. Med. – Czech, 39, 1994 (10): 615–624.

The occurrence and expansion of avian mycobacteriosis in the pigeon, its sensitivity to infection and epizootological importance as a source of *M. avium* were investigated. A total of 470 pigeons were examined coming from seven localities with different epizootological situation in avian tuberculosis. Tuberculous lesions were found out in 2 birds (0.43%) and mycobacteria were isolated from five birds (1.06%). Four out of the five isolated strains of mycobacteria were pathogenic to the domestic fowl. Experimental infections demonstrated the pigeon's high resistance to *M. avium*. Intramuscular infection with the suspension of *M. avium* induced histological lesions in the muscle at the spot of puncture in a fortnight, in the liver it was in 28 days, in the lungs and intestines in 56 days. Macroscopic changes were observed at the spot of puncture only in 21 days, but they were not observed in other organs and tissues. The mycobacteria were isolated since the 12th day after infection, particularly from the muscle at the spot of puncture, from liver, spleen and medulla. Macroscopic changes were found out in the intestine in 160 days after peroral infection with feed contaminated with the liver of tuberculous fowl. The mycobacteria of various organs and tissues were isolated from the pigeons killed in 160 days. After a contact with the tuberculous fowl histological changes in the intestinal wall were observed in 380 days in one case only and the mycobacteria were demonstrated by cultivation in the medulla of a pigeon which died in 68 days.

Columba livia f. *domestica*; avian mycobacteriosis; epizootology; pathogenesis

Contact Address:

Doc. MVDr. František T r e m l, CSc., Vysoká škola veterinární a farmaceutická,
Palackého 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 41

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

DOC. MVDR. ING. JAN VLČEK, CSC. – ŽIVOT A DÍLO

Dne 23. ledna 1909 se v Dačicích, v rodině zámečnicka, narodil syn Jan. Prožil tam dětství, chodil do obecné a měšťanské školy a poté dojížděl do Telče na reálné gymnázium.

V roce 1928 maturoval a přišel na Vysokou školu zvěrolékařskou v Brně. Již jako student pracoval na fyziologickém ústavu, zprvu jako demonstrátor. V roce 1932, po absolutoriu, se za byrokratických průtahů stal výpomocným asistentem a bylo mu, jako svobodnému, povoleno na ústav bydlet. V příštím roce se po dokončení zkoušek stal asistentem. Nastávajícího léta odešel do Olomouce na dvouletou vojenskou službu. Pak se na ústav vrátil a jeho každoročně opakovaným žádostem o ponechání na místě asistenta bylo i nadále vyhověno přesto, že se v září 1936 oženil. Při plnění povinností asistenta počal se souhlasem MŠaNO v roce 1937 studovat na hospodářské fakultě brněnské Vysoké školy zemědělské a ještě stačil vykonat zvěrolékařskou fyzikální zkoušku. V dubnu příštího roku si na škole vyžádal doklady k žádosti o přijetí do služeb Zemského úřadu v Brně. Zřejmě pomýšlel na stabilizaci své existence, na stálé zaměstnání. Přišel však podzim 1938 a dr. Vlček byl mobilizován. Po několika týdnech se vrátil a na škole zůstal.

Jako první asistent plnil pod vedením profesora Vacka nejen povinnosti spojené s organizačním zabezpečováním nerušeného chodu ústavu, ale stal se i plodným vědeckým pracovníkem. Během sedmi let se autorsky podílel na dvaceti publikacích, z toho třinácti experimentálních (H o l u b , 1972). Přispíval jimi k tehdejšímu výzkumnému profilování ústavu ve vitaminologii, endokrinologii a rozpracoval i některé problémy termické polypnoe psů. Jeho zájmu neunikly ani další oblasti tehdejšího našeho veterinárního života. Technicky totiž pomáhal profesoru Vackovi v organizačních funkcích a v odborném tisku o veterinárním dění informoval. Profesor Vacek, dbalý vysokého standardu naší veterinární fyziologie a mající na spolupracovníky velké nároky, byl s dr. Vlčkem spokojen. V roce 1937 si pochvalně zaznamenal, že se do pokusné aktivity ústavu dobře zapracoval.

Přišel listopad 1939. Nacisti školu zavřeli a uvedli ji do komisařské správy. Při vyřizování záležitostí školy, a to i pracovních, se postupovalo tak, že komisařský správce školy, s nímž spolupracoval rektor, předkládal své návrhy na opatření kurátorovi, a ten jen po prošetření NSDAP a Gestapem předával dr. Eccardovi, referentovi pro školu v úřadu státního sekretáře a od roku 1943 říšského státního ministra a generála policie K. H. Franka. Komisařským správcem školy pro personální a badatelské záležitosti byl okupačními úřady jmenován člen NSDAP, vládní rada doc. MVDr. A. Srnetz, který se netajil tím - jak později napsal profesor Pardubský - že všichni lidé na škole jsou přísně střeženi. Fyziologický ústav byl zlikvidován k 9. 2. 1940. Od toho dne tam pracovníci nesměli. Prostory ústavu začaly sloužit jiným účelům a jeho technické vybavení bylo rozmetáno. Vlčkův fyziologický svět se rozpadl.

Některá zařízení školy však v provozu zůstala a nacisti zde povolili i výzkum. Dr. Vlček se pokoušel přejít na dosud fungující buiatrickou kliniku, vedenou profesorem Kloboukem; 29. 3. 1940 k tomu MŠaNO dalo souhlas. Zemský úřad v Brně to rektorátu školy 18. 4. 1940 oznámil a dr. Vlček na klinice nastoupil. Rektor školy to krátce poté sdělil MŠaNO. Po osmi dnech je však požádal, aby mu zaslalo opis přípisu, jímž komisařský správce školy k Vlčkovu převodu svolil, a zakrátko, 19. 5. 1940, profesoru Kloboukovi napsal, že tento nacistický funkcionář s přechodem dr. Vlčka na kliniku nesouhlasí, protože se tak stalo bez jeho vědomí. Prof. Klobouk proto 31. 5. 1940 rektora požádal, aby dr. Vlček mohl na klinice zůstat. Doc. MVDr. A. Smetz se však mezitím k Vlčkovu působení vyjádřil negativně, a to i v dopise profesoru Vackovi, který u něho zřejmě intervenoval. A tak poslušné MŠaNO svůj předchozí souhlas s převedením dr. Vlčka odvolalo; 8. 6. 1940 rektor školy profesoru Kloboukovi oznámil, že žádost profesora Vacka o převedení dr. Vlčka, kterou odeslal bez vědomí rektorátu, byla komisařským správcem zamítnuta. Již za dva dny poté to sdělil i MŠaNO a ještě 17. 6. 1940 mu neopomněl oznámit, že přidělení dr. Vlčka buiatrické klinice odvolal. Během této, doc. MVDr. A. Smetzem vyvolané byrokratické smršti došlo mezi rektorem Pardubským a profesorem Vackem, jak dr. Vlček později též dosvědčil, i k osobnímu jednání a výstupu. A tak mladý asistent fyziologického ústavu, dr. Vlček, byl sice zatím na škole ponechán, ale službu vykonávat nesměl.

Tyto události se staly prologem několika osobních tragedií. Dr. Vlček byl záhy nabídnut k převedení do služeb ministerstva zemědělství. Přes velmi pohotový souhlas rektora školy byl však uvolněn teprve po dlouhých průtazích, dohadech a po dotazech brněnského Zemského úřadu, zda není námitek. A tak teprve v dubnu 1941 nastoupil v atmosféře rozpaků a pochybovačného váhání u Zemských výzkumných ústavů zemědělských v Brně. Po té mu byla na škole ještě prodloužena asistentura, a to do konce září 1943. Při tehdy nařízené zkoušce z němčiny neobstál. Proto mu byly služební požitky od června 1942 o 10 % kráceny. S účinností od 1. 5. 1943 byl jako zemský komisař převeden z působnosti MŠaNO do služeb Země moravské. Tím bylo jeho první vypuzení z Vysoké školy veterinární dovršeno a formalizováno.

Druhému aktéru pokusu o udržení dr. Vlčka na škole, profesoru Kloboukovi, byla rozhodnutím z 29. 5. 1943 samostatná buiatrická klinika zrušena a včleněna do pracoviště profesora Přibyla.

Osud dalšího účastníka sporu o dr. Vlčka, profesora Vacka, se naplnil nejtragičtěji. V prosinci 1941 byl zatčen a v roce 1942 v koncentračním táboře Mauthausen zahynul (K o l d a, 1946; P í š a a V l č e k, 1957; H o l u b, 1968, 1973).

Chmurnost a tvrdost těchto osudových zkoušek umocňuje fakt, že se účastníci střetů o existenci dr. Vlčka na škole dobře znali. V roce 1935 se totiž o habilitaci z fyziologie počal ucházet MVDr. R. Nesseni, městský zvěrolékař v České Kamenici, a MVDr. A. Smetz, v té době asistent chirurgické kliniky, jejímž přednostou byl profesor Pardubský, shodou okolností též rektor školy v době nacistické okupace. Oba uchazeči o docenturu měli totiž zájem o místo profesora na zemědělském oddělení pražské německé techniky v Libverdě. Jak si profesor Vacek zapsal, po poradě s kolegy se rozhodl, že k habilitaci

doporučí MVDr. A. Srnetze s tím, že vykoná aspoň nějaké práce v oboru fyziologie. Stalo se. S profesorem Vackem publikoval výsledky pokusů o řízení dýchání, činnosti srdeční a krevního tlaku u koně (H o l u b , 1972). Do jaké míry splnil habilitant očekávání erudovaného fyziologa dokumentuje zcela neobvyklý a naprosto nebývalý fakt: MVDr. A. Srnetz se profesorovi Vackovi písemně, reverzem zavázal, že se nikdy nebude ucházet o místo na brněnské veterinární fyziologii a že má zájem jen o habilitaci pro Libverdu. Poté, 27. 2. 1936, byl habilitován a na německou techniku odešel. Po listopadu 1939 se však jako člen NSDAP a představitel nacistické moci ve funkci komisařského správce na školu vrátil, poškozoval, ponižoval, utiskoval a pronásledoval.

Případ dr. Vlčka nebyl totiž ojedinělý. Dokládá to další aféra. V dusné a napjaté atmosféře léta roku 1940 pořádal profesor Pardubský v brněnském Plzeňském dvoře v České ulici pro již zmíněného dr. Eccarda z úřadu K. H. Franka, nejvlivnějšího z nově dosazených protektorátních veterinárních hodnostářů (M a r t í n e k , 1993), a pro přednosty ústavů a klinik, které na škole zůstaly otevřeny, večeri. Jeden z jejich účastníků, profesor Hanslian, měl tehdy s hostěným představitelem nacistické moci – jak později zapsal prof. Pardubský – nedorozumění. Důsledky se dostavily v roce 1943. Postižený byl zbaven vedení podkovárny i kuřimského školního statku a obě jeho funkce převzal profesor Pardubský.

V brněnských Zemských výzkumných ústavech zemědělských se dr. Vlček snažil. Analyzoval vývoj z plemenářského kontrolního rejstříku za léta 1926 až 1940. Publikoval práce o gestaci prasnic a o prenatalní mortalitě selat v moravských kmenových stádech prasnic. Ale ani ve výzkumu natrvalo nezakotvil. V lednu 1945 byl beze změny platu nasazen jako praktický veterinář na jatky do Jemnice.

Válka skončila. Přišla svoboda a škola začala znovu žít. Bylo třeba vzkřísit i fyziologii. Profesor Vacek byl mrtev, a tak profesorský sbor školy na své první schůzi v červnu 1945 rozhodl, aby přednášky, cvičení a zkoušky z fyziologie zabezpečil dr. Vlček. Profesor Kolda přitom prozíravě upozornil, že pověřený působí v praxi, a proto je nutno uspokojivě řešit jeho finanční ohodnocení. Po opakovaném jednání sboru v červenci bylo zatímní pověření dr. Vlčka omezeno na přednášky, s čímž MŠaO vysloвило souhlas. Dr. Vlček v té době dokončil válkou přerušené studium na Vysoké škole zemědělské a na podzim požádal o zavedení habilitačního řízení. Jeho průběh byl hladký. Nepochybně k tomu přispělo i vyjádření člena habilitační komise, profesora Koldy, že profesor Vacek dr. Vlčka za svého možného nástupce před svým zatčením označil. V lednu 1946 byl po habilitačním kolokviu pověřen i zkouškami a v dubnu téhož roku se stal přednostou ústavu. V květnu 1946 mu byla *venia docendi* pro obor fyziologie udělena a záhy potom byl profesorským sborem školy navržen na jmenování mimořádným profesorem. I nadále však zůstával zaměstnán jako veterinární komisař Okresního národního výboru Brno-venkov. Školou mu byl od června 1946 do března 1948 poukazován pouze docentský příspěvek.

V tomto období rozvíjel docent Vlček vedle přednáškové činnosti především intenzivní aktivitu organizátorskou. Z předválečných učitelů fyziologie zůstal, a to jen jako externista, na škole sám. Některé zkušenosti z konce třicátých let mu mohl pomoci přenést jen bývalý Vackův demonstrátor, nový, ještě studující asistent ústavu,

Jan Mertlík. Ústav byl více než dva roky zatímne dislokován v provizoriu. Zabíral několik málo místností ve druhém poschodí ústavu hygieny a technologie potravin, který pro fyziologická praktika zapůjčoval i vlastní cvičebnu. Pracně byly shledávány poničené a poškozené zbytky technického ústavního vybavení, které docent Vlček za války i ukrýval a za účinné pomoci mechanika ústavu Lněničky zprovozňoval. Díky nezdolné iniciativě, neúporné práci a soustředěnému úsilí se v létě roku 1948 podařilo ústav přemístit do jeho předválečných prostorů v budově číslo 32, a to do druhého poschodí s výjimkou severního bočního traktu, do podkroví a do části suterénu. Začalo se i s úpravami docentem Vlčkem nově získaného objektu číslo 3 a přiléhajících voliér i výběhů. Technické vybavení ústavu se podařilo doplnit též přístroji ze zásob UNRRA. V té době organizátorská činnost docenta Vlčka na škole vrcholila. Fyziologický ústav byl hmotně znovuvzkrýšen, revitalizován a až pietně věrně uváděn do podoby zděděné po profesorech Babákovi a Vackovi. Byl také jako Vackův fyziologický ústav slavnostně pojmenován. V tomto období čilého organizačního ruchu a přesunů bylo v ústavu dokončeno i několik doktorských dizertací, které byly zpracovávány pod vedením profesora Vacka již před válkou. Sám docent Vlček v té době vědecky pracovat nestačil. Velmi aktivně se však zapojil do komise profesorského sboru školy pro dislokaci veterinárního studia, jejímiž členy byli i profesor Klobouk, Příbýl a Štencl, a která usilovala o paralýzu snah veterinární veřejnosti a studentů o reorganizaci školy na fakultu a její přenesení do Prahy. Tyto skryté i bouřlivé střety ukončil únor 1948.

V té době byl docent Vlček přijat do KSČ, a to mimo školu. Přesto byl jako jeden z prvních školskými stranickými orgány postížen. Koncem března 1948 mu byla akčním výborem udělena důtka a v profesorském sboru byl zbaven možnosti hlasovat. Opakovaně se odvolával. O využití pracovních možností, které se definitivně dislokací ústavu otevřely, přestal usilovat. Jiným však v práci nebránil. Doufal, že snad přece jen profesorem jmenován bude a na školu jako její řádný pracovník přejde. Navenek počal projevovat o ústavní dění až okázalý nezájem. Posléze, pod zvyšujícím se tlakem a při rostoucích komplikacích, potížích a šikanách požádal, aby byl z funkce vedoucího ústavu uvolněn, výuky zproštěn a na členství ve školních komisích rezignoval. Zdůvodňoval to zdravotními problémy. Nepřízeň vedení školy tím však neumenšil. A tak jeho žádosti o dočasné uvolnění z učitelských povinností, kterou předložil i MŠVU, bylo k jeho nemalému zklamání vyhověno. Byla vzata na vědomí. Na návrh profesora V. Jelínka pak byla česká veterinární fyziologie až na další svěřena vrchnímu veterinárnímu radovi MVDr. Václavu Moravcovi, který, jak o sobě říkával, ve fyziologii sice nepracoval, ale vždy v ní vynikal. Osud docenta Vlčka se tak na škole naplnil podruhé. Jeho působení ve veterinární fyziologii opět skončilo.

Všichni učitelé, kteří s ním na ústavu spolupůsobili, byli postupně rozeznáni. Docent Vlček sám pracoval i nadále jako veterinář v okrese Brno-venkov a zakrátko, na začátku roku 1950, byl v nově vzniklém okrese Židlochovice pověřen organizováním zvěrolékařské služby. Zde pak, jako okresní veterinář, působil více než devět let.

Koncem padesátých let byl vyzván, aby přešel do veterinárního výzkumu. Proto vyvolal jednání, na němž se za účasti pracovníků orgánů KSČ různých stupňů, až po ÚV, prokázalo, že se obvinění vznesená pro němu v roce 1948 na Vysoké škole

veterinární nezakládají na pravdě. V únoru 1959 pak nastoupil do Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně-Medlánkách. Po průtazích – neměl vědeckou hodnost a jak konstatovala atestační komise ČSAV, ve vědě šestnáct let nepracoval – byl zařazen s osobním platem jako inženýr 1. stupně na oddělení zoohygieny a zootechniky. V dubnu 1960 mu pak bylo svěřeno vedení ústavu a ve funkci ředitele setrval do února 1967. V ústavu navázal na své působení v praxi, na zkušenosti z produkce mléka a masa a zaměřil se na výzkum tehdy velmi aktuální problematiky – vztahu prostředí velkých produkčních jednotek vybavených průmyslovými prvky k fyziologickým a zoohygienickým parametrům různých kategorií skotu. Výsledky své práce shrnul do tří výzkumných zpráv a zveřejnil je v publikacích o zoohygienických podkladech pro výstavbu stájí pro skot a o veterinárních opatřeních při volném ustájení ve velkovýrobních technologiích skotu. Na základě dosažených výsledků mu pak byla v listopadu 1966 veterinární fakultou v Košicích udělena hodnost kandidáta věd.

I v tomto údobí extenzivně organizoval; nejen jako ředitel VÚVL, ale i v komisích veterinárního odboru ČSAZV, jako člen vědecké rady brněnské veterinární fakulty, tří výzkumných ústavů zaměřených na živočišnou výrobu a v redakční radě periodika Veterinární medicína.

V polovině šedesátých let však bylo rozhodnuto, aby z VÚVL odešel a v květnu 1967 byl převeden na brněnskou agronomickou fakultu. Jako samostatný vědecký pracovník zde pokračoval v řešení výzkumného úkolu, převedeného z VÚVL, a nadále čile spolupracoval s výzkumnou základnou ministerstva zemědělství. Brzy byl zařazen na místo docenta a za rok po svém nástupu na vysokou školu byl znovu – po více než dvaceti letech – fakultou navržen na mimořádného profesora fyziologie a etologie hospodářských zvířat. Ani tentokrát nebylo řízení v normalizačním období realizováno, a tak docent Vlček své vysokoškolské působení v únoru 1974 odchodem do důchodu ukončil.

Ale i pak v odborné aktivitě pokračoval. Přešel do zemědělského družstva v Moutnici, kde našel přátele již v padesátých letech, v době svého praktického působení na Židlochovicku. Zaměřil se na komplex problémů, především zoohygienických, podnikové živočišné výroby. Jeho rady a zásahy byly ekonomicky výhodné a prospěšné. Byl oblíben, a tak ve vysoko ceněné odborné aktivitě setrval v družstvu až do konce svých dnů; 14. října 1986 v Brně zemřel.

Doc. MVDr. ing. Jan Vlček, CSc., byl činný v různých oblastech zvěrolékařství od třicátých do sedmdesátých let. Ve veterinárních vědách působil ve třech historickými přerывy oddělených údobích.

Ve třicátých letech se během krátké doby vypracoval na nadějný spolupracovník profesora Vacka. V zájmu hmotného zabezpečení rodiny však byl nucen uvažovat o rezignaci na tehdy málo perspektivní dráhu vysokoškolského učitele. Ani po případné habilitaci pro něj jiné než asistentské místo nebylo.

V poválečném, jen čtyřletém období byl nečekaně postaven před úkol vyvést českou veterinární fyziologii z válečného rozvalu a destrukce. Třebaže nebyl zaměstnancem školy, zůstal externistou, nezměrně obětavě organizoval znovuvybudování bývalého Vackova ústavu, posluchárny, cvičeben, laboratoří, pracoven, přístrojů a knihovny tak, že výuka nebývalého počtu posluchačů mohla být zabezpečena.

Na začátku šedesátých let pak byl postaven do čela našeho veterinárního výzkumu. Vědecky se orientoval nově. Zaměřil se na fyziologickou, etologickou a zoohygienickou problematiku skotu. V jejím řešení pokračoval i po přechodu na agronomickou fakultu brněnské Vysoké školy zemědělské.

Všechny etapy jeho působení na vysokých školách a ve výzkumných ústavech byly zmarněny. Znovu a znovu se stával nepřijatelným. Ponížili jej představitelé a vykonavatelé nacistické zvláště, po únoru se znelíbil kolegům a na začátku sedmdesátých let uvázl v síti normalizátorů. Opakovaný návrh na jeho jmenování vysokoškolským profesorem nebyl nikdy uskutečněn.

Ve veterinární fyziologii byl docent Vlček programovým následovníkem profesora Vacka třicátých let. Jeho stín nepřekročil. Zůstal jeho žákem. Jako představiteli veterinárního výzkumu mu nebylo popřáno, aby se jako vůdčí duch a garant pokroku ve svém oboru projevil; zůstal především jeho dbalým, operativním, až hyperaktivním organizátorem a čilým, pilným administrátorem. Vlastní vědeckou tvář etapám, které měl možnost ovlivňovat, se mu vtisknout nepodařilo. Snad k tomu ani necítil. Přes opakovanou, nervní, těkavou až erupivní snahu se osobností, na níž by mohly naše veterinární vědy stavět, nestal. Nezklamal, ale prostor, který mu byl opěťovaně na čas popřán, jako perspektivní novátor a strůjce naší veterinární budoucnosti z více příčin vyplnit nemohl.

P r a m e n y

Biografický fond historického archivu kabinetu dějin veterinární medicíny Vysoké školy veterinární a farmaceutické v Brně.

Bibliografický fond archivu Vysoké školy zemědělské v Brně.

L i t e r a t u r a

HOLUB, A.: Fyziologie. In: 50 let vysokého veterinárního učení v Brně. Brno, 1968: 136–143.

HOLUB, A.: List of publications. 1933, 1934, 1936, 1937, 1938, 1939, 1940. Katedra fyziologie. Vysoká škola veterinární Brno, Czechoslovakia. Brno, 1972.

HRADIL, M.: Doc. dr. inž. Jan Vlček vedoucím Výzkumného ústavu veterinárního ČSAZV v Brně. Veterinářství, 10, 1960, č. 5.

MARTÍNEK, B.: Prezident Zvěrolékařské komory MVDr. Jaroslav Kunstýř (7. 1. 1894–19. 10. 1954). Veterinářství, 43, 1993: 475–478.

PROCHÁZKA, Z.: 10 let Výzkumného ústavu veterinářského lékařství v Brně. Brno, 1966. 40 s.

Antonín Holub

OBSAH – CONTENTS

Rychlík I., Bejčková L.: Oligonucleotide (GTG) ₅ in bacterial DNA fingerprinting – Využití oligonukleotidu (GTG) ₅ při DNA fingerprintingu bakterií	567
Diba F., Vinkler A., Groch L.: Obsah testosteronu ve tkáních varlat a nadvarlat při histopatologických změnách ve varlatech býků – Contents of testosterone in testicular and epididymal tissues with histopathological changes in the testes of bulls	579
Gajdošová E., Kováčová E., Kazár J., Kolcunová A., Sabó A.: Imunogenéznost vakcíny proti enzootickému potratu oviec – Immunogenicity of vaccine against enzootic abortion of ewes	589
Fortýn K., Hruban V., Horák V., Hradecký J., Tichý J.: Melanoblastomová nemoc u laboratorních miniprasat: model pro studium lidských maligních melanomů – Melanoblastoma disease in laboratory minipigs: a model for study of human malignant melanomas	597
Holub A., Baranyiová E., Ponížilová E.: Změny hydratace slepičích a kachních vajec během inkubace – Changes in hydration of fowl and duck eggs during incubation	605
Hejlíček K., Tremel F.: Epizootologie a patogeneze aviární mykobakteri- ózy holuba domácího (<i>Columba livia</i> f. <i>domestica</i>) – Epizootology and pathogene- sis of avian mycobacteriosis in the pigeon (<i>Columba livia</i> f. <i>domestica</i>)	615
Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA	
Holub A.: Doc. MVDr. ing. Jan Vlček, CSc. – život a dílo	625

UPOZORNĚNÍ PRO ODBĚRATELE

Od letošního roku vyřizuje veškeré služby spojené s distribucí časopisu Veterinární medicína vydavatel – Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha.

Objednávky na předplatné posílejte na adresu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
referát odbytu
Slezská 7
120 56 Praha 2

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Česká akademie zemědělských věd a Slovenská akadémia pôdohospodárskych vied – Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Vychází měsíčně ● Redaktorka: ing. Zdenka Radošová ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Pražská 108, 266 01 Beroun, tel.: 0311/240 15 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1994

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 7, 120 56 Praha