

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

2

VOLUME 42 (LXIX)
PRAHA
JANUARY 1997
CS ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření České akademie zemědělských věd a s podporou Ministerstva zemědělství České republiky

An international journal published by the Czech Academy of Agricultural Sciences and with the promotion of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic

Editorial Board – Redakční rada

Chairman – Předseda

Prof. MVDr. Karel Hruška, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Members – Členové

Doc. MVDr. ing. Jiří Brož, CSc., Reinfelden, Switzerland

Arnost Cepica, DVM., PhD., Associate Professor (Virology/Immunology), Atlantic Veterinary College, U.P.E.I., Charlottetown, Canada

RNDr. Milan Fránek, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Ivan Herzig, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumír Hofírek, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MUDr. Drahomír Horák, DrSc., Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. František Kovářů, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MUDr. M. V. Nermut, PhD., DSc. (h. c.), National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

Prof. MUDr. MVDr. h. c. Leopold Pospíšil, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s.,

Jilové u Prahy, Czech Republic

Prof. MVDr. Zdeněk Věžník, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

Cíl a odborná náplň: Časopis Veterinární medicína uveřejňuje původní vědecké práce a studie typu review ze všech oblastí veterinární medicíny v češtině, slovenštině a angličtině.

Časopis je citován v bibliografickém časopise Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, a abstrakty z časopisu jsou zahrnuty v těchto databázích: Agris, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 42 vychází v roce 1997.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Zdeňka Radošová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a zasílají se na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1996 je 564 Kč.

Aims and scope: The journal Veterinární medicína original publishes papers and reviews from all fields of veterinary medicine written in Czech, Slovak or English.

The journal is cited in the bibliographical journal Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, abstracts from the journal are comprised in the databases: Agris, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicity: The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 42 appearing in 1997.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: Ing. Zdeňka Radošová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1996 is 132 USD (Europe), 138 USD (overseas).

A STUDY OF THE DYNAMICAL ULTRAMICROMORPHOLOGY OF DIFFERENTIATING COW EARLY EMBRYO NUCLEOLI IN EMBRYOS COLLECTED IN THE AREA OF CHRONIC IRRADIATION NEAR TCHERNOBYL

DYNAMICKÁ ULTRAMIKROMORFOLÓGIA NUKLEOLÁRNEHO APARÁTU PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÍ KRÁV Z OBLASTI CHRONICKÉHO RÁDIOAKTÍVNEHO OŽIARENIA

J. Pivko,¹ V. Baran,² P. Grafenau,¹ V. Kopečný,³ N. S. Pelechatyj,⁴
V. N. Bondarčuk,⁴ A. J. Kožuch,⁵ L. M. Kovalčík⁵

¹ *Research Institute of Animal Production, Nitra, Slovak Republic*

² *Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic*

³ *Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Praha, Czech Republic*

⁴ *Research Institute of Farming in the Nonchernozem Zone of Ukraine, Korosten, Ukraine*

⁵ *Ukrainia Biotechnological Center, Lvov, Ukraine*

ABSTRACT: Ultrastructural morphology and immunoelectron microscopy of the nucleus and nucleogenesis in early preimplantation cow embryos were applied in an attempt to demonstrate a possible radiation injury to that early stage of development due to chronic irradiation of the animals in the Tchernobyl area. Mostly eight cell embryos as well as morulae were collected from superovulated cows which were previously constantly kept in zones of different levels of radioactive irradiation. In addition to the normometric status of reproductive organs in no case was it possible to detect an apparent deviation in the nuclear morphology or in the process of nucleogenesis as compared to the physiological situation (Kopečný et al., 1989b, 1991, 1996). This observation was supported by an immunoelectron microscope study of DNA association and penetration in the differentiated nucleolus in the late 8-cell stage. These observations show that the otherwise demonstrated radiation injury localized in the genome does not probably influence markedly the early events of the developing embryo and that the aberrant cytoplasmic command of the nuclear events known in other types of oocyte/early cow embryo impairment (review Kopečný and Niemann, 1993; Kaňka et al. 1991; Pavlok et al., 1993) is not seen in early embryos collected from chronically irradiated animals.

cow; early embryo; nucleogenesis; irradiation; Tchernobyl

ABSTRAKT: Ultraštruktúrálnu morfológiu a imunoelektrónovú mikroskopiu jadier a nukleogenézy raných preimplantačných embryí kráv sme použili v snahe demonštrovať možné radiačné poškodenie spôsobené v tomto ranom štádiu vývoja v dôsledku chronickej iradiácie zvierat v oblasti Černobyľu. Embryá v štádiu štyroch až ôsmich blastomér ako aj moruly sme odoberali superovulovaným krávam, ktoré boli pred tým nepretržite chované v zónach s rôznou úrovňou rádioaktívneho žiarenia. Okrem normometrického stavu reprodukčných orgánov nebolo možné zistiť zjavnú odchýlku ani v morfológii jadra ani v procese nukleogenézy v porovnaní s fyziologickou situáciou (Kopečný a i., 1989a, b, 1991, 1996). Tento poznatok sa potvrdil pri skúmaní asociácie DNA a jej penetrácie do diferencovaných jadierok v neskorom 8-bunkovom štádiu pomocou imunoelektrónovej mikroskopie. Tieto pozorovania ukázali, že poškodenia spôsobené rádioaktivitou a lokalizované v genóme, ktoré boli demonštrované iným spôsobom, pravdepodobne významne neovplyvňujú skoré deje vo vyvíjajúcom sa embryu a že aberantný cytoplazmický pokyn na odchýlné deje v jadre, ktoré sú známe pri iných typoch poškodenia oocytov a raných embryí kráv (Kopečný a Niemann, 1993; Kaňka a i., 1991; Pavlok a i., 1993) sme v raných embryách odobraných chronicky ožiareným zvieratám nezaznamenali.

kravy; rané embryá; nukleogenéza; rádioaktívne ožiarenie; Černobyľ

ÚVOD

Ultraštruktúrálna morfológia jadra a nukleogenézy raných preimplantačných embryí hovädzieho dobytká môže byť použitá ako kritérium životaschopnosti a potenciálu pre normálny vývoj (Kopečný a Niemann, 1993; Kaňka a i., 1991; Pavlok a i., 1993). V tejto práci informujeme o pokuse aplikovať podobný prístup ako selekčné kritérium pri hodnotení embryí hovädzieho dobytká, ktoré sme získali v oblasti chronického rádioaktívneho ožiarovania.

Následky nehody, ktorá sa stala pred viac ako 10 rokmi v atómovej elektrárni v Černobyle, boli najviac študované v ľudskej populácii. Okrem priameho vplyvu radiácie na obyvateľstvo kontrolnej zóny buď z prostredia, alebo z kontaminovaných potravín, je tu ešte veľa problémov, ktoré treba riešiť. Jedným z nich je udržiavanie genetickej integrity hospodárskych zvierat, hlavne hovädzieho dobytká a ošipáných. Naša práca bola preto zameraná na sledovanie embryí hovädzieho dobytká, ktoré sme získali v oblasti Černobyľu bežnými metódami (Pivko a Grafenau, 1987) a ktoré by umožnili selekciu embryí pri prenose za predpokladu vhodných metód výberu.

V proliferujúcich cicavčích tkanivách je štúdium radiáčného účinku založené na parametroch bunkovej kinetiky a na špecifických ultramikromorfologických nálezoch (Pottén, 1990). Už pri veľmi nízkych príľivoch žiarenia vznikajú v jadre bunky poruchy nezlučiteľné s jej ďalším životom. Na rozdiel od tejto situácie u cicavčích pohlavných buniek sa jedná o bunky terminálne diferencované, u ktorých niektoré funkcie žiareniu odolávajú (Rugh, 1960) a špecifická je i situácia u novovzniknutého embrya do doby nástupu syntézy vlastnej, t. j. autonómnej transkripcie genetickej informácie RNA. U kráv autorádiografické štúdie lokalizujúce transkripciu ukazujú, že (³H)uridín, prekursor RNA, bol inkorporovaný do nukleoplazmy a nukleolárneho aparátu raných preimplantačných embryí až na konci 8-bunkového štádia (Camous a i., 1986). U raných embryí kráv je tento začiatok syntézy RNA spojený s veľmi dobre definovaným ultraštruktúrálnym obrazom (Pivko a i., 1986; Kopečný, 1990; Kopečný a i., 1989a, b, 1991, 1996; Baran a i., 1996).

MATERIÁL A METÓDA

Získavanie embryí

Rané preimplantačné embryá boli získané (v priebehu spoločného experimentu, ktorý bol organizovaný na Ukrajine zúčastnenými ústavmi) po zabití superovulovaných kráv, ktoré boli chované v rôznych zónach rádioaktívneho ožiarovania po Černobyľskej havárii (tab. I).

Kravy boli stimulované za účelom superovulácie Follicotropinom Spofa (Léčivá, Praha, ČR) bežným spôsobom v 12-hodinových intervaloch pri celkovej

I. Úroveň ožiarovania ¹³⁷Cs pôdy, mlieka a krmív v troch rôznych zónach (Pelechatyj, 1993 – osobný odkaz) – The level of ¹³⁷Cs irradiation of soil, milk and feeds in three different zones (Pelechatyj, 1993 – personal communication)

Zóna ¹	Pôda ² (Ci/km ²)	Mlieko ³ (nCi/kg)	Krmivá: siláž, seno ⁴ (nCi/kg)
I	0–1	0,3.10 ⁻⁸	0,5/1,5.10 ⁻⁸
II	5–10	0,4.10 ⁻⁸	0,8/2,9.10 ⁻⁸
III	20–40	1,6.10 ⁻⁸	1,2/5,1.10 ⁻⁸

¹zone, ²soil, ³milk, ⁴feeds, silage, hay

dávke 24 mg *i.m.* (4,4; 4,4; 2,2; 2,2 mg) a synchronizované PGF₂alfa prípravkom Remophanom (Léčivá, Praha, ČR) dávkou 2 ml + 1 ml *i.m.* (Grafenau a i., 1988).

Po klinickom zhodnotení izolovaných pohlavných orgánov sme vypreparované vajcovody následne prepláchlí roztokom Krebs-Ringer fosfát. Získané embryá sme vyhodnotili podľa všeobecne platných kritérií hodnotenia vývojového štádia a kvality (Stringfellova a Seidl, 1990). Rané embryá kráv sme spracovali pre morfológickú (EM) a imunoelektrónmikroskopickú (IEM) analýzu.

Príprava embryí pre ultraštruktúrálnu (EM) a imunoelektrónoptickú (IEM) analýzu

Vybrané embryá sme fixovali bežným spôsobom pre EM (Pivko a i., 1986), alebo jednu hodinu pri teplote 4 °C v 4% paraformaldehide (Merck, puriss) v Sörensenovom fosfátovom pufrí pri pH = 7,4 pre IEM. Po premytí v tom istom pufrí za 12 až 36 hodín pri teplote 4 °C boli následne blokované voľné aldehydické skupiny pufrovaným 0,5M NH₄Cl a znovu premyté. Embryá boli následne zaliate do LR White. Ultratenké rezy sme urobili na ultramikrotóme LKB Nova. Sietky s ultratenkými rezi boli inkubované s myšacou monoklonálnou protilátkou proti DNA pre zviditeľnenie lokalizácie DNA (Baran a i., 1996). Všetky elektrónogramy sme kontrastovali 2,5% uranylacetátom a citrátom olova a analyzovali elektrónovým mikroskopom JEM 100 CX-II pri 80 kV (tab. II).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Klinickým vyšetrením získaných pohlavných orgánov kráv chovaných v tretej (III) zóne ožiarovania (tab. I) po ich zabití sme nezistili žiadne orgánové poruchy.

Celkom sme od superovulovaných daryň (n = 15) získali 109 všetkých embryí, z ktorých bolo 71 vhodných (tab. III). Rané embryá boli prevažne v štádiu štyroch až osmich blastomérov (n = 37), menej v štádiu 16 blastomérov, t. j. z obdobia začiatku ich kompaktizácie, alebo ranej moruly. Ich zóna pellucida bola intaktá, blastomérov pravidelne vyvinuté a perivitelinný priestor transparentný bez bunkových fragmentov. Výskyt

II. Rané embryá kráv použité pre elektrónovú a imunoelektrónovú mikroskopiu – Early cow embryos used for electron and immunoelectron microscopy

Číslo ¹	Code embryí ²	Zóna ožiarenia ³	Štádium, počet blastomér ⁴	Fixácia zalievania ⁵	Štádium NPB ⁶	Imunocytochemická DNA ⁷
1	K 142	III.	8	PF/LR White	2	
2	K 131	III.	8	PF/LR White	2	
3		III.	8	PF/LR White		+++
4		III.	8	PF/LR White		
5	1242/1	III.	raná morula	PF/LR White	4	+++

Vysvetlivky – Explanatory:

PF = 4% paraformaldehyd, 1 hodina – 4% paraformaldehyde, 1 hour

NPB = nucleolus-precursor body I. až 4. štádium (Kopečný, 1990 – vid obr. 1) – nucleolus-precursor body, 1st to 4th step

(Kopečný, 1990 – see Fig. 1)

+ pozitívna – positive

+++ veľmi pozitívna reakcia – very positive reaction

DNA (d) = distribúcia DNA – DNA distribution

¹no., ²embryo code, ³radiation zone, ⁴stage, blastomere number, ⁵fixation, embedding, ⁶NPB step, ⁷immunocytochemical DNA

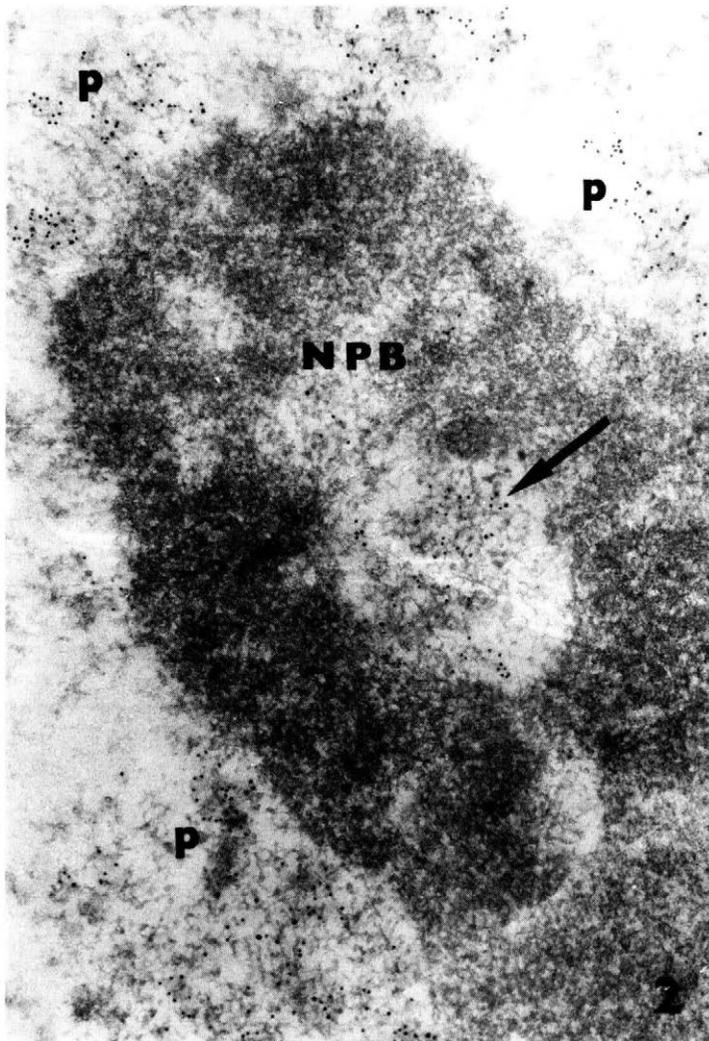
III. Zisk a vývojové štádiá raných embryí kráv z troch zón ožiarenia – Recovery and developmental stages of early cow embryos from three radiation zones

Zóna ¹	Počet ²	Počet získaných embryí ³		Vývojové štádiá ⁶			
		všetkých ⁴	vhodných ⁵	4-blastomér ⁷	8-blastomér ⁸	16-blastomér ⁹	raná morula ¹⁰
I.	5	36	19	3	8	8	–
II.	5	35	28	5	12	11	–
III.	5	38	24	2	7	7	8

¹zone, ²number, ³number of recovered embryos, ⁴all, ⁵livable, ⁶developmental stages, ⁷4-blastomere, ⁸8-blastomere, ⁹16-blastomeres, ¹⁰early morula

EMBRYO	NUCLEOLUS		
	Cleavage Stage	Step of Nucleogenesis	Transcription DNA Localization
4-cell	1.	Nucleolar Precursor Body	
		2.	Vacuolated Nucleolar Precursor Body
8-cell	3.	Nucleoli With Secondary Vacuoles	
		4.	Reticulated Fibrillogranular Nucleoli

1. Morfológická a imunocytochemická analýza nukleogenézy raných embryí kráv z III. zóny ožiarenia. Schématické zobrazenie diferenciácie jadierka v 8-blastomérovom embryu kravy (Kopečný, 1990, na podklade autorádiografických údajov). Lokalizácia novosyntetizovanej RNA (= nástup vlastnej transkripcie, prepis embryonálnych génov) bola detekovaná v 3. štádiu nukleogenézy u pozdných 8-bunkových embryí. Tento dej je podmienený vstupom DNA do nukleolárneho precursoru – Morphological and immunocytochemical analysis of nucleolus differentiation in 8-blastomere cow embryo (Kopečný, 1990, on the basis of autoradiographic data). Localization of newly synthesized RNA (= onset of own transcription, transcription of embryonic genes) was detected in the 3rd step of nucleogenesis in late 8-cell embryos. This event is conditioned by DNA entry into nucleolar precursor



2. Morfológická a imunocytochemická analýza nukleogenézy raných embryí kráv z III. zóny ožiarenia Imunoelektrónogram 0042: Morula (Embryo 1242/1) z III. zóny ožiarenia. V ultratenkom reze jadra embrya bolo možné pomocou imunoelektrónovej mikroskopie detekovať prestavu nukleolárneho prekursora na jadierko, čo je podložené vstupom rDNA do vnútra (do vakuoly) nukleolárneho prekursora (šípka). Prítomnosť DNA indikujú partikule zlata (tmavé bodky), ktoré boli zviazané so špecifickou protilátkou. Značenie je rovnako masovo demonštrované aj v chromatine priliehajúcemu k NPB (perinukleolárny chromatin – P). Podobnosť značených DNA štruktúr vo vnútri jadierka a v perichromatine je demonštrovaná aj morfológicky; zväčšenie 50 000x – Morphological and immunocytochemical analysis of nucleogenesis of early cow embryos from radiation zone III. Immunoelectronogram 0042: Morula (Embryo 1242/1) from radiation zone III. In ultrathin section of the embryo nucleus it was possible to detect the transformation of nucleolus precursor to the nucleolus, which results from the entry of rDNA into the inside (vacuole) of nucleolus precursor (arrow). DNA presence is indicated by gold particles (dark dots) which were bound to a specific antibody. Labelling is also demonstrated at a mass scale in chromatin adherent to NPB (perinucleolar chromatin – P). Similarity of labelled DNA structures in the inside of the nucleolus and in perichromatin is also demonstrated morphologically; 50 000x enlargement

poškodených a fragmentovaných embryí neprekročil všeobecnú normu z populácie získaných embryí.

V materiáli, ktorý bol analyzovaný v týchto experimentoch rané embryá kráv v štádiu osmich blastomérov, získané z tretej (III.) zóny ožiarenia predstavovali najviac obdobie začiatku kompaktizácie blastomérov.

Dynamika molekulárnych dejov prebiehajúcich počas nukleogenézy v preimplantačných embryách kráv koreluje pravdepodobne s morfológickým obrazom začiatku transkripcie a je možné ju rozdeliť do štyroch štádií (Kopečný, 1990) – obr. 1.

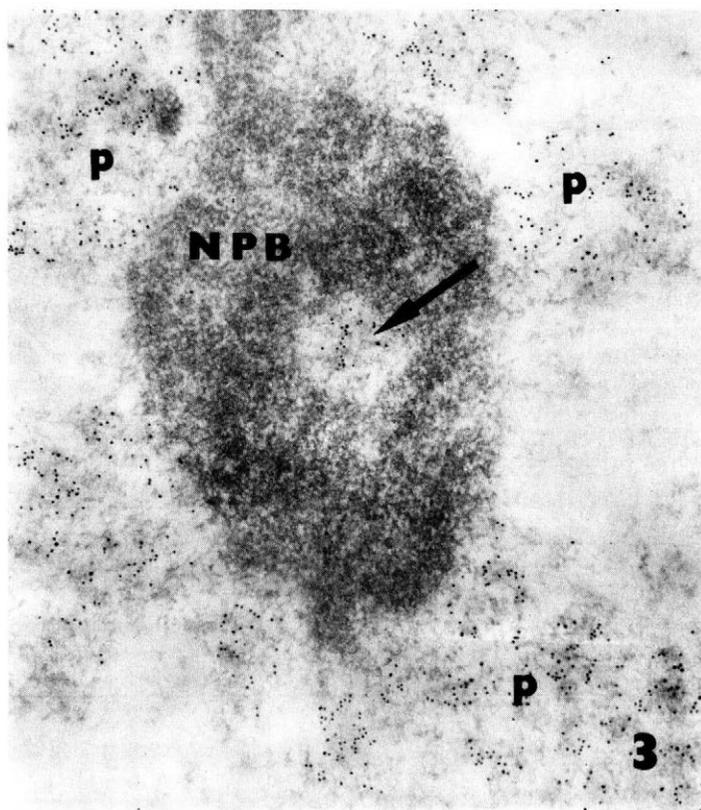
Z tohto hľadiska ultraštruktúrne hodnotenie dosiahnutého stupňa nukleogenézy a tým i štádium nástupu syntézy ribozomálnej RNA (rRNA) ukazuje, že jadierko získaných embryí nebolo ešte funkčné, ale nachádzalo sa na začiatku druhého štádia vývoja. Je preto označené ako „nucleolus – precursor body“ (NPB 2; obr. 1). Detaily tohto štádia sme doplnili technikou ul-

tramikrotómie na sériových rezoch, ktorá umožňuje priestorovú charakteristiku.

V našom experimentálnom usporiadaní, s prihliadnutím k diskutovanému cytologickému základu (Baran a i., 1996), bol materiál získaný v Korostene spracovaný tak, aby umožňoval podobné použitie najmä imunocytochemických metód s možnosťou elektrónopického štúdia.

Od druhého štádia NPB 2 sme takto zistili lokalizovanie DNA vo forme husto usporiadanej fibrilárnej sieťoviny v okolí NPB (perinukleolárny chromatin). Od tretieho štádia NPB 3, keď sa vyvíjajú sekundárne jadierkové vakuoly bolo značenie (DNA) výrazne prítomné i v týchto vakuolách (obr. 2, 3).

Doterajšie dielčie výsledky umožňujú definovať v chronicky ožarovaných oblastiach normometrický vývin NPB 2 a NPB 3, t.j. štádiá nukleogenézy, odpovedajúce nenarušenému začiatku aktivácie syntézy



3. Morfológická a imunocytochemická analýza nukleogenézy raných embryí kráv z III. zóny ožiarenia. Imunoelektrónogram N 0041: Iný ultratenký rez toho istého embrya ako na obr. 2 demonštruje tu istú distribúciu DNA; zväčšenie 60 000x – Morphological and immunocytochemical analysis of nucleogenesis of early cow embryos from radiation zone III. Immunoelectronogram N 0041: Another ultrathin section of the same embryo as in Fig. 2 demonstrates the identical DNA distribution; 60 000x enlargement

rRNA v ranom 8-bunkovom embryu kráv. Podľa analógie s našimi predchádzajúcimi prácami (K o p e č n ý , 1990; K o p e č n ý a i., 1989a, b) je to teda štádium predchádzajúce asociácii ribozomálnych génov s proteínmi jadierka. Radiačné poškodenie, ktoré podľa mnohých údajov postihuje genetický materiál sa teda výrazne neprejavuje v mechanizmoch aktivácie raného embrya hovädzieho dobytku. Vzhľadom k tomu aj pre reprodukčnú prax u hovädzieho dobytku a bezprostredne i pre prax prenosu embryí sa iradiácia neprejavuje ako faktor limitujúci vývoj raného embrya.

PodĎakovanie

Autori práce ďakujú pani Ľudvike Dobrovodskej za technické spracovanie vzoriek.

LITERATÚRA

BARAN, V. – FLÉCHON, J. E. – PIVKO, J. (1996): Nucleogenesis in the cleaving bovine embryo. Immunocytochemical aspects. *Mol. Reprod. Develop.*, *44*, 63–70.
CAMOUS, S. – KOPEČNÝ, V. – FLECHON, J. P. (1986): Autoradiographic detection of earliest stage of (³H)-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol. Cell.*, *58*, 195–200.

GRAFENAU, P. – PIVKO, J. – OVČINIKOV, A. (1988): Superovulácia kráv Follicotropinom Spofa inj. ad usum vet. a FSH-P. *Biol. Chem. Vet.*, *24*, 197–202.

KAŇKA, J. – FULKA, J. Jr. – PETR, J. (1991): Nuclear transplantation in bovine embryo: fine structure autoradiographic studies. *Mol. Reprod. Dev.*, *29*, 110–116.

KOPEČNÝ, V. (1990): Nucleogenesis in cow embryo: Relation between onset of transcription and penetration of DNA into nucleolar precursor body. In: HARRIS, J. R. – ZBARSKÝ, I. B. (ed.): *Nuclear Structure and Function*. Edited New York, Plenum Press, pp. 181–191.

KOPEČNÝ, V. – FLECHON, J. E. – CAMOUS, S. – FULKA, J. Jr. (1989a): Nucleogenesis and the onset of transcription in the 8-cell bovine embryo: Fine structural autoradiographic study. *Mol. Reprod. Develop.*, *1*, 79.

KOPEČNÝ, V. – FULKA, J. Jr. – PIVKO, J. – PETR, J. (1989b): Localization of replicated DNA containing sites in preimplantation bovine embryo in relation to the onset of RNA synthesis. *Biol. Cell*, *65*, 231–238.

KOPEČNÝ, V. – FAKAN, S. (1992): Extranucleolar genome reactivation: Topochemical studies on early bovine embryo. A review. *Acta Histochem., Suppl.*, *42*, 301–309.

KOPEČNÝ, V. – NIEMANN, H. (1993): Formation of nuclear microarchitecture in the preimplantation bovine embryo at the onset of transcription as a prerequisite for further de-

- velopment: Implication for biotechnology. *Theriogenology*, **39**, 109–119.
- KOPEČNÝ, V. – FAKAN, S. – PAVLOK, A. – PIVKO, J. – GRAFENAU, P. – BIGGIOGERA, M. – LESER, G. – MARTIN, T. E. (1991): Immunoelectron microscope localization of small nuclear RNPs during bovine early embryogenesis. *Mol. Reprod. Develop.*, **29**, 209–219.
- KOPEČNÝ, V. – BIGGIOGERA, M. – PIVKO, J. – GRAFENAU, P. – PAVLOK, A. – MALATESTA, M. – MARTIN, T. E. – FAKAN, S. (1996): The cell nucleus in early bovine and caprine preimplantation embryos: fine structural cytochemistry and immunoelectron microscopy. *Eur. J. Cell. Biol.*, **70**, 361–372.
- PAVLOK, A. – KOPEČNÝ, V. – LUCAS-HAHN, A. – NIEMANN, H. (1993): Transcriptional activity and nuclear ultrastructure of 8-cell bovine embryos developed by *in vitro* maturation and fertilization of oocytes from different growth categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Develop.*, **35**, 233–243.
- PIVKO, J. – KOPEČNÝ, V. – TOMÁNEK, M. – KAŇKA, J. – FLÉCHON, J. E. (1986): Autoradiography of ³H-uridine incorporation in the normal early blastocysts of cattle. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **26** (4), 1009–1015.
- PIVKO, J. – GRAFENAU, P. (1987): Prenos embryí hovädzieho dobytku. Košice, Inštitút výchovy a vzdelávania veterinárnych lekárov.
- POTTEN, C. S. (1990): A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF₁) small intestine. *Int. J. Radiat. Biol.*, **58**, 925–973.
- RUGH, R. (1960): In: ERRERA, M. – FORSBERS, A. (eds.): *Mechanisms in Radiobiology*. Vol. 2., New York, Academic Press.
- STRINGFELLOW, D. A. – SEIDEL, S. M. (1990): *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 2nd ed. Champaign, USA, IETS.

Received: 96–07–08

Accepted: 96–08–23

Kontaktná adresa:

Prof. MVDr. Juraj P i v k o , DrSc., Výskumný ústav živočíšnej výroby, Ústav reprodukcie a embryológie zvierat, Hlohovská 2, 949 92 Nitra, Slovenská republika
Tel., fax: 087/51 80 94

AN EQUINE INFLUENZA OUTBREAK IN THE CZECH REPUBLIC IN THE FALL OF 1995: AN EPIDEMIOLOGICAL STUDY*

EPIZOOTOLOGICKÁ STUDIE VZPLANUTÍ CHŘIPKY KONÍ V ČESKÉ REPUBLICE NA PODZIM ROKU 1995

P. Lány, Z. Pospíšil, D. Zendulková, P. Číhal, P. Jahn

Univerzity of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: A mild outbreak of acute respiratory infection was reported in racing horses in the fall of 1995. Four studs were investigated for the sources and routes of infection. In five horses from two herds, virus isolates were obtained which, in preliminary typing experiments, were identified as the influenza A/equi 2 virus. The presence of this illness in all the examined herds was confirmed by a rise in specific antibody titres. The affected animals included both older vaccinated horses and young horses not yet vaccinated. Epidemiological studies suggested that the spread of infection occurred in situations where infected and non-infected horses were together, most frequently at races. Newly infected horses brought the infection back to their studs where further animals became infected. Some of them, still being in the incubation period without any clinical signs, may have taken part in another race and passed the infection onto healthy animals from other studs. Since the races usually took place in 7-day intervals, the epidemiological chain remained continuous. The causes of the outbreak of infection in vaccinated horses are analysed. The length of post-vaccination immunity, the antigenic composition of vaccines and their completion with new strains of the influenza virus are discussed.

horse; influenza; virus; antibodies; epidemiology

ABSTRAKT: Na podzim roku 1995 proběhla na našem území u sportovních koní poměrně mírná vlna akutního respiračního onemocnění. Ve čtyřech chovech jsme sledovali zdroje a cesty šíření infekce. Od pěti nemocných koní ze dvou chovů se nám podařilo izolovat virus, který byl v předběžných typizačních pokusech určen jako virus chřipky A/equi 2. Infekce tímto virem byla ve všech chovech potvrzena vzestupem specifických protilátek. Ve sledovaných chovech onemocněli jak starší vakcinovaní koně, tak i mladší koně bez vakcinace. Epizootologické studie ukázaly, že k přenosu infekce dochází při setkání koní vylučujících virus s koňmi vnímavými, což bývá nejčastěji na závodech. Čerstvě nakažení koně se vrací do svých stájí, kde následně infikují ostatní koně. Někteří z nich se na konci inkubační doby, ještě bez klinických příznaků, mohou zúčastnit dalších závodů a šířit nákazu dále. Jelikož se závody obvykle konají v sedmidenních intervalech, zůstává epizootický řetězec nepřerušen. Jsou diskutovány příčiny onemocnění vakcinovaných koní a je zvažována délka postvakcinační imunity, antigenní složení vakcín a vhodnost jejich případného doplnění aktuálními kmeny influenzových virů.

koně; influenza; virus; protilátky; epizootie

ÚVOD

Chřipkové onemocnění koní probíhá cyklicky v nestejných časových intervalech a je způsobené většinou kmeny s rozdílnými antigenními vlastnostmi. Poslední takové onemocnění, které proběhlo na našem území v roce 1989 (Pospíšil aj., 1991), bylo způsobené subtypem viru chřipky A/equi 2 (H3N8). K ochraně před infekcí byla vyvinuta řada vakcín obsahujících oba subtypy chřipky A/equi, případně i další virové patogeny respiračního traktu. Podle nařízení Státní veterinární správy v Praze musí být všichni koně účastníci se hromadných akcí vakcinováni. Podobná nařízení platí i v zahraničí

(Bendixen aj., 1993). Přesto byly hlášeny ojedinělé epizootie chřipkových onemocnění v Evropě: v Západním Berlíně v letech 1988 až 1989 (Lange et al., 1992) a 1991 (Jaeschke a Lange, 1993), v Norsku v roce 1989 (Gudding a Johansen, 1990), ve Švédsku v letech 1990 až 1991 (Bendixen aj., 1991, 1993), ve Velké Británii 1993 (Mumford, 1994) a ve Švýcarsku v roce 1995 (Meier aj., 1995). I na našem území proběhla na podzim roku 1995 vlna akutního respiračního onemocnění koní. V průběhu této epizootie jsme měli možnost vyšetřit několik chovů sportovních koní na Moravě a sledovat řetězec nákazy. Výsledky izolací a epizootologického šetření jsou předmětem našeho sdělení.

* Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 508/95/0183).

MATERIÁL A METODY

Sledované chovy

Byly sledovány čtyři chovy sportovních koní, označených písmeny A až D.

V chovu A bylo ustájeno celkem 40 koní. Ze 31 koní starších tří let, ustájených individuálně v boxech, jich bylo 25 vakcinováno proti chřipce vakcínou 1, obsahující viry influenzy A/equi 1/ Praha, A/equi 2/ Miami a Detroit. Poslední vakcinace byla provedena 6,5 měsíce před vznikem onemocnění. Zbývající zvířata, včetně devíti koní ve věku do tří let, ustájených volně ve dvou skupinách, zůstala nevakcinována.

Na stejné farmě bylo ustájeno i 10 koní z chovu B, patřícího jinému majiteli. Koně byli umístěni v oddělené stáji sousedící s objektem chovu A a byli ošetřováni jiným personálem. Všichni tito koně byli starší tři let a byli naposledy vakcinováni šest měsíců před začátkem onemocnění rovněž vakcínou 1.

V chovu C bylo 10 koní, z nichž pět bylo vakcinovaných. Poslední vakcinace byla provedena šest měsíců před začátkem onemocnění vakcínou 2, obsahující viry influenzy A/equi 1/ Praha, A/equi 2/ Miami a Fontainebleau.

V chovu D bylo 12 koní, z nichž byla polovina vakcinována. Předchozí vakcinace byla provedena šest měsíců před začátkem onemocnění vakcínou 3, obsahující kmeny influenzy A/equi 1/ Praha, A/equi 2/ Miami a Francie.

Odběr materiálu

Od koní s klinickými příznaky akutního respiračního onemocnění byly k virologickému vyšetření odebrány nosní výtěry pomocí sterilních vatových tampónů. Vzorky byly vloženy do kultivačního média Eagle MEM s 500 m.j. penicilinu na 1 ml a s 500 µg streptomycinu na 1 ml a použity k bezprostřední infekci kuřecích embryí nebo buněčných kultur, anebo byly zamrazeny v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C.

Koním ze všech sledovaných chovů byly odebrány párové vzorky krevních sér pro sérologické vyšetření v intervalu 15 až 35 dnů.

Virologické vyšetření

Odebrané výtěry byly podrobeny virologickému vyšetření. K průkazu přítomnosti influensových virů byly vyšetřované vzorky aplikovány v dávce 0,2 ml do alantoidního vaku devítidenních kuřecích embryí. Ta byla po tři dny inkubována při teplotě 37 °C a každý den prosvěcována. Odumřelá embrya byla skladována při teplotě 4 °C. Po 72 hodinách inkubace byla živá embrya na 18 až 20 hodin zchlazena při teplotě 4 °C a sterilně odebraná alantoidní tekutina byla vyšetřována hemaglutinačním testem na přítomnost influensových virů.

K možnému průkazu dalších virů byla dávkou 0,2 ml odebraného vzorku infikována buněčná linie RK 13. Kul-

tivace byla prováděna ve třech slepých pasážích, při nichž byl hledán případný vznik cytopatického efektu.

Hemaglutinační test byl prováděn na polystyrenových mikrodestičkách s dnem ve tvaru písmene U v objemech 0,05 ml za přidání stejného množství 1% suspenze slepičích erytrocytů.

Sérologické vyšetření

Dynamiku specifických protilátek proti viru influenzy jsme sledovali pomocí hemaglutinačně inhibičního testu na polystyrenových mikrodestičkách v objemu 25 µl. Dvojnásobná ředění sér jsme vyšetřovali s následným přidáním čtyř hemaglutinačních jednotek viru influenzy A/equi 2/ Brno 89 a později i s izolátem z probíhající epizootie, označeným dodatečně A/equi 2/ P2 95. Po 60minutové inkubaci jsme přidali 50 µl 1% suspenze slepičích erytrocytů. Reakce byla odečítána po 50 až 60 minutách stání při pokojové teplotě (Pospíšil aj., 1991).

VÝSLEDKY

Epizootologie náказы

Čtyři koně z prvního námi sledovaného chovu A byli na závodech č. 1 začátkem září 1995 v Polské republice a při zpáteční cestě nocovali v Čechách společně s koňmi z jiných chovů, z nich někteří údajně kašlali. Po návratu ze závodů byli umístěni do svých boxů a zúčastňovali se běžného tréninku s ostatními koňmi. Týden po prvních závodech se čtyři jiní koně z tohoto chovu zúčastnili závodů č. 2 na Moravě (obr. 1) a dva dny po návratu z těchto závodů většina koní v chovu A klinicky onemocněla. Přitom první čtyři koně, účastníci závodů v Polsku, zůstali bez klinických příznaků a infekce u nich byla potvrzena až vysokými hladinami specifických protilátek již při prvním odběru.

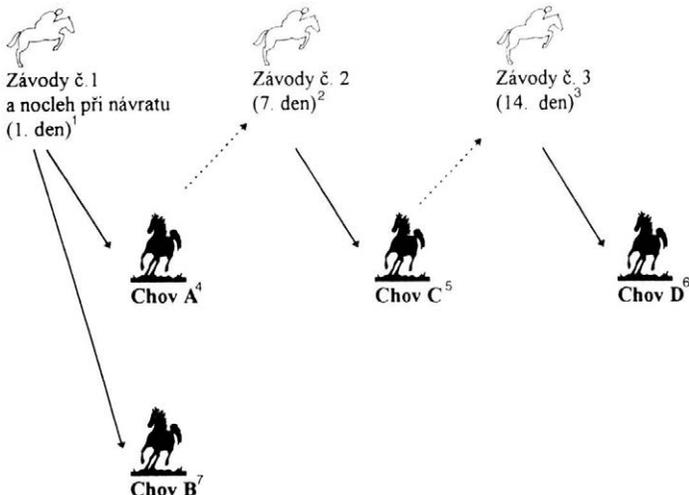
Ve stejný čas onemocněli také koně chovu B ustájení v těže budově, ale prostorově oddělení. Tito koně se žádných závodů nezúčastnili, ale používali stejné tréninkové prostory. Z toho vyvozujeme, že koně, kteří přijeli ze závodů č. 1, infikovali ke konci inkubační doby ostatní koně v chovu A i B.

Za předpokladu, že inkubační doba byla i u těchto koní stejná, trvala přibližně pět dnů.

Závodů č. 2 se také zúčastnili koně z chovu C. Po svém návratu pokračovali jako zdraví v dalším tréninku s ostatními koňmi. Za týden po těchto závodech se jiný kůň z chovu C zúčastnil závodů č. 3, na kterých již klinicky onemocněl. Další koně z tohoto chovu onemocněli v následujících dnech.

Vydeme-li ze stejných předpokladů, jako v předchozím případě, byla v tomto chovu inkubační doba asi tři až čtyři dny.

Závodů č. 2 i 3 se zúčastnili koně z chovu D. Vzhledem k tomu, že se u nich onemocnění objevilo až



1. Šíření infekce mezi jednotlivými chovy – Infection spreading from stud to stud

¹race no. 1 and lodging before return (day 1), ²race no. 2 (day 7), ³race no. 3 (day 14), ⁴stud A, ⁵stud B, ⁶stud C, ⁷stud D

24 dnů po závodech č. 2, je možné předpokládat, že se infikovali až na závodech č. 3.

Klinický průběh

V chovu A onemocněli všichni nevakcinovaní koně ve věku do tří let. Ze starších nevakcinovaných koní onemocněli čtyři a z vakcinovaných jich onemocnělo 18.

Klinický průběh onemocnění u mladých nevakcinovaných koní ve věku do tří let byl spojen s teplotou přetrvávající tři až čtyři dny a nepřesahující 40,6 °C, doprovázenou kašlem a výtokem z nosder.

U starších vakcinovaných i nevakcinovaných koní mělo onemocnění mírnější průběh, horečky nebyly vyšší jak 39,6 °C, nevyskytovaly se u všech nemocných zvířat a infekce byla doprovázena jen mírným kašlem nebo výtokem z nosder. Kromě dvou koní onemocnění odeznělo během několika dní.

V chovu B onemocněli všichni koně navzdory tomu, že byli vakcinováni. Průběh onemocnění byl podobný jako v předchozím chovu, ale teploty dosáhly u některých koní až 40,8 °C.

V chovu C nebyly měřeny teploty a klinický průběh onemocnění byl vyjádřen pouze kašlem u dvou nevakcinovaných a jednoho vakcinovaného koně z deseti. Celkový zdravotní stav nebyl narušen.

V chovu D onemocnělo sedm koní ze 12, včetně tří vakcinovaných. U všech nemocných koní byl pozorován kašel a výtok z nosder, ale pouze u tří nemocných nevakcinovaných koní se vyskytla teplota dosahující 40,1 °C.

Izolace viru

Ve vzorcích z chovů A i B, které byly odebrány k vyšetření prakticky až po odeznění klinických příznaků onemocnění, se nepodařilo ve třech slepých pasážích izolovat žádný virus.

Z nosních výtěrů dvou koní z chovu C bylo již v první pasáži izolováno na kuřecích embryích hemaglutinující agens, které bylo pomocí specifických antisér předběžně určeno jako virus influenzy A/equi 2. Stejný druh viru byl izolován i od dalších koně z této lokality, ale až ve třetí pasáži. Rovněž z chovu D se nám ve dvou případech podařilo ve druhé pasáži izolovat obdobný virus influenzy A/equi 2. Izolace byly úspěšné pouze v případě nevakcinovaných, klinicky nemocných koní.

Konečnou identifikaci izolátů a jejich zařazení mezi viry influenzy A/equi 2 provedla dr. B. Tůmová, DrSc., z Národní referenční laboratoře pro chřipku Státního zdravotního ústavu v Praze.

V pokusech o izolaci dalších virů nebyl na buněčné línii RK 13 prokázán ve třech slepých pasážích žádný cytopatický efekt, který by svědčil pro virovou infekci.

Sérologické vyšetření

Podezření na chřipku koní bylo potvrzeno několika-násobným vzestupem specifických hemaglutinačně inhibičních protilátek proti oběma použitým kmenům influenzy v párových vzorcích krevních sér odebraných od vakcinovaných i nevakcinovaných koní. Ve všech chovech se za jeden měsíc po proběhlé infekci pohybovaly titry protilátek proti viru A/equi 2 přibližně v rozmezí 1 : 64 až 1 : 1 024.

Zatímco u vakcinovaných koní se titry iniciálních protilátek na začátku infekce pohybovaly v rozmezí 1 : 16 až 1 : 64 a po proběhlém onemocnění vzrostly pouze dvojnásobně až trojnásobně, byly postinfekční titry protilátek u nevakcinovaných koní prokazovány ještě v šesti- až osminásobném ředění séra.

Hodnoty titrů protilátek byly zcela srovnatelné, ať již byl v testu použit virus influenzy A/equi 2/ Brno 89 nebo náš nový izolát A/equi 2/ P2 95. Protilátky proti viru A/equi 1/ Praha byly v nízkých titrech prokazovány pouze u vakcinovaných koní.

DISKUSE

Izolaci viru influenzy A/equi 2 a průkazem vzestupu specifických postinfekčních protilátek jsme potvrdili nové vzplanutí chřipky u koní. Při epizootologickém studiu tohoto onemocnění se ukázalo, že hlavní roli v šíření nákazy má vzájemný kontakt koní vylučujících virus v inkubačním stadiu onemocnění a ostatních koní účastnících se závodů. Koně se z takových závodů vracejí již infikováni, avšak v inkubačním stadiu zůstává nákaza nerozpoznána a jsou proto většinou zařazeni do tréninku spolu s ostatními koňmi. Mnozí koně se přitom nakazí, avšak opět ještě v inkubační době startují další víkend na jiných závodech, čímž se udržuje v permanenci epizootický řetězec. Je to dáno především inkubační dobou, pohybuji se okolo pěti dnů, a skutečností, že mnohdy onemocní i vakcinovaní koně, u nichž nemusí být příznaky onemocnění příliš nápadné. Situaci komplikují i samotní chovatelé, kteří z obavy před uzavřením chovu první případy onemocnění tají.

Naše výsledky ukázaly, že žádná ze tří použitých vakcín nezabránila ve sledovaných chovech vzniku a šíření onemocnění. Podobné výsledky zaznamenali v Evropě Lange aj. (1992), Bendixen aj. (1993), Gudding a Johansen (1990), Meier aj. (1995). Tito autoři se domnívají, že současné kmeny viru influenzy koní mají driftem změněné antigenní vlastnosti ve srovnání s kmeny dosud používanými ve vakcínách. Sérologicky to prokázali Lange aj. (1992), Jaeschke aj. (1993) a sledováním pořadí nukleotidů v RNK viru A/equi 2 Oxburgh aj. (1993).

Všechny námi sledované vakcíny obsahovaly virus influenzy A/equi 1/ Praha a A/equi 2/ Miami. Vakcína č. 1, která nezabránila vzniku klinického onemocnění, obsahovala navíc i kmen A/equi 2/ Detroit. Vakcíny č. 2 a 3, u nichž se projevil alespoň částečný ochranný efekt proti klinickému projevu onemocnění, obsahovaly místo posledně jmenovaného viru kmeny relativně novější – A/equi 2/ Fontainebleau nebo Francie. I tyto kmeny však byly izolovány před mnoha lety a proto by bylo prospěšné doplnit stávající vakcíny novými izoláty.

Přes všechny tyto úvahy však nesmíme zapomenout ani na tu skutečnost, že vzhledem ke krátkodobé imunitě u influenzy koní, která nepřesahuje šest měsíců, doporučují někteří odborníci (Tůmová, 1972; Eichhorn, 1989) vakcinovat dvakrát ročně. Výskyt epizootie na podzim, tedy právě šest až šest a půl měsíců po vakcinaci, kdy již ochranný efekt vakcínace pravděpodobně poklesl, mohl být i dalším důvodem, proč onemocněli i vakcinovaní koně.

Epizootologické studie poslední, poměrně mírné vlny chřipkového onemocnění u koní poukázaly na komp-

lexnost celé problematiky. V současné době probíhají detailní studie, které by měly blíže charakterizovat antigenní složení našich izolátů. Teprve po jejich podrobném poznání a srovnání se stávajícími vakcinačními kmeny bude možno zvážit, zda doporučit doplnění současných vakcín o tyto aktuální kmeny.

LITERATURA

- BENDIXEN, P. H. – FORSSBERG, P. – SILFERBERG, L. (1991): Vaccination status and fever in trotting horses in relation to influenza outbreaks in spring 1991. *Sven. Vet.-Tidn.*, 43, 713–715.
- BENDIXEN, P. H. – EMANUELSON, U. – FORSSBERG, P. – SILFERBERG, L. (1993): Analysis of status of vaccination and development of fever in trotters in Sweden during an outbreak of influenza type A2 (H3N8). *Prevent. Vet. Med.*, 16, 95–102.
- EICHHORN, W. (1989): Respiratorische Infektionskrankheiten beim Pferd. *Prakt. Tierärztl.*, 44, 37–45.
- GUDDING, R. – JOHANSEN, G. I. (1990): The significance of age and vaccination interval on the protection of horses against equine influenza. *Nor. Vet. Tidsskr.*, 102, 35–36.
- JAESCHKE, G. – LANGE, W. (1993): Beobachtungen bei equinen Influenza-Epidemien mit viraler Antigendrift in Berlin 1988–1991. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 106, 119–123.
- LANGE, W. – JAESCHKE, G. – MASIHI, K. N. – TROSCHKE, B. – KILB, K. – ZADOW, I. (1992): Equine influenza in West Berlin, 1988 to 1989. *Tierärztl. Umsch.*, 47, 7–16.
- MEIER, H. P. – HAUSER, R. – WEISS, M. – TSCHANZ, T. H. – WAMPFLER, B. – WEIBEL-ATTENBERGER, P. (1995): Epizootic Situation in Switzerland. In: 1995 EFTEBA Veterinary Meeting, Deauville, 16. 10. 1995.
- MUMFORD, J. A. (1994): Update on equine influenza. *Vet. Rec.*, 134, 3.
- OXBURGH, L. – BERG, M. – KLINGEBORN, B. – EMMOTH, E. – LINNE, T. (1993): Equine influenza virus from the 1991 Swedish epizootic shows major genetic and antigenic divergence from the prototype virus. *Virus-Res.*, 28, 263–272.
- POSPÍŠIL, Z. – TŮMOVÁ, B. – ULMANN, L. – ZENDULKOVÁ, D. – FALTEJSEK, J. (1991): Epizootics of equine influenza in Czechoslovakia caused by the type A/equi 2(H3N8) and the effects of vaccination. *Acta Vet. (Brno)*, 60, 153–159.
- TŮMOVÁ, B. (1985): Laboratorní diagnostika chřipky. In: SYRŮČEK, L. a kol.: Vyšetřovací metody virových onemocnění dýchacích cest. Praha, Avicenum, s. 75–99.

Received: 96-07-18

Accepted: 96-08-21

Kontaktní adresa:

MVDr. Petr Láň, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1–3, 612 42 Brno
Tel.: 05/41 32 11 07, fax 05/74 88 41, e-mail: zdosp@diior.ics.muni.cz

LYMPHOCYTIC THYROIDITIS IN BEAGLE DOGS IN A BREEDING COLONY: HISTOLOGICAL FINDINGS

LYMFOCYTÁRNÍ THYREOIDITIS PSŮ PLEMENE BEAGLE V CHOVNÉ KOLONII: HISTOLOGICKÉ NÁLEZY

L. Vajner¹, V. Vortel², A. Brejcha²

¹ *Institute of Histology and Embryology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Praha, Czech Republic*

² *Department of Pathology, Research Institute for Pharmacy and Biochemistry, Rosice nad Labem, Czech Republic*

ABSTRACT: During the 18-year (1974–1991) period the lymphocytic thyroiditis was found in 8% of 2 238 animals from a Beagle dog breeding colony (8.5% of 1 079 males and 7.6% of 1 159 females). The thyroid glands of affected animals were on average heavier by 10.4% in males and by 21.0% in females. In the histological picture the interstitial lymphocytic infiltrations of various ranges accompanied by varying degree of follicular damage prevailed. The earliest findings of this lesion were revealed in 9-month old animals.

lymphocytic thyroiditis; histopathology; Beagle dog

ABSTRAKT: Během 18 let (1974 až 1991) sledování chovné kolonie psů beagle byla u 8 % z 2 238 zvířat (8,5 % z 1 079 samců a 7,6 % z 1 159 samic) odhalena lymfocytární thyreoiditis. Průměrná hmotnost štítné žlázy postižených zvířat byla vyšší o 10,4 % u samců a o 21,0 % u samic. Histologický obraz léze byl převážně tvořen intersticiálními lymfocytárními infiltráty různého rozsahu, doprovázenými poškozením foliklů v různém stupni. Nejčasnější nálezy této léze byly zjištěny u devítiměsíčních zvířat.

lymfocytární thyreoiditis; histopatologické nálezy; pes beagle

INTRODUCTION

A major part of the data concerned with the lymphocytic thyroiditis (LT) of the dogs originally came from toxicologic studies or breeding colonies. The required data appertaining to the situation within pet populations were not available (Scarlett, 1994). A more detailed description of spontaneous LT in a group of Beagles was given by Tucker (1962). Histologically the lesions were found in 16.2% of animals without there being any dependence upon the sex. The animals had neither clinical signs nor gross findings. Within the breeding colonies other cases were described by Mawdesley-Thomas and Jolly (1967), Mawdesley-Thomas (1968), Musser and Graham (1968), Beierwaltes and Nishiyama (1968) and Hottendorf and Hirth (1974). LT occurred in 12.5–13% of males and 10.9–11% of females. The earliest findings were revealed in 6-month old animals, most of the investigated dogs were at the age of 13 and 14 months. Histological descriptions were almost identical. Fritz et al. (1970) stated the lesion occurrence of even 20% for an inbred line. In agreement with other researchers Gosselin et al. (1982) distinguished two findings, firstly LT, and sec-

ondly the idiopathic follicular atrophy, manifesting itself in the destruction of follicles and the replacement of those with adipose tissue, leaving only scanty isolated follicular epithelia. Mariotti et al. (1989) found most of the cytotoxic T lymphocytes in emperipolesis within the follicular epithelia and acting as effectors of tissue destruction. Lombardi et al. (1988) attributed the destruction of the thyroid gland follicles to the complement activation due to deposition of immunocomplexes Tg – TgAb (thyroglobulin – antibody) within the thyroid gland.

The C cell hyperplasia was a common phenomenon in patients with Hashimoto's thyroiditis as documented by Libbey et al. (1989) and LiVolsi (1990). Harach (1993) noticed C cell hyperplasia having a relation with the destructive inflammatory processes. Mawdesley-Thomas and Jolly (1967) also found parafollicular cell hyperplasia within more severely involved thyroids in Beagles.

MATERIAL AND METHODS

2 238 young and adult animals from a semi-closed Beagle dog breeding colony, owned by the Research

Institute for Pharmacy and Biochemistry at Rosice nad Labem, Czech Republic, were autopsied and histologically examined during an eighteen year period (1974–1991). They served as experimental animals for various drug safety-evaluating studies or came as old animals from the breeding colony. 1 079 of them were males, 1 159 females.

All dogs were vaccinated at the age of 6 and 12 weeks against canine parvovirus (since 1984), at 15 weeks against canine distemper virus and canine adenovirus type II. All dogs were also immunized at 24 weeks against rabies virus. The dogs also received routine anthelmintic treatments.

Each animal was completely autopsied. Major organs including the thyroid gland were routinely weighed and tissue samples of all organ systems were fixed in 10% neutral buffered formaldehyde. Histological slides were made by the common paraffin technique, sectioned at 6 μ m, and stained with haematoxylin-erythrosin (HE).

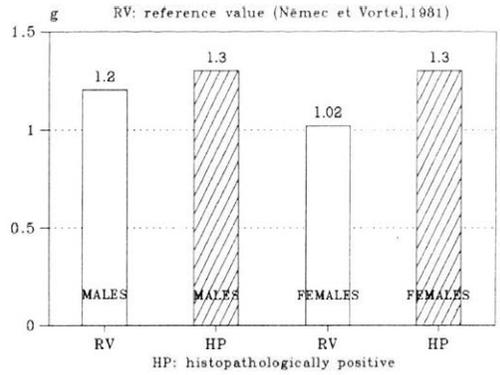
Additional sections of thyroid glands were stained with periodic acid-Schiff (PAS) technique, cresyl fast violet, phosphotungstic acid-haematoxylin (PTAH), Congo red, and by methods after Hale-Müller, Grimelius (argyrophil stain), Perls (for iron), Gomori (for reticulin), and von Kossa to aid in the evaluation of individual lesions.

RESULTS

The length of the thyroid gland lobes varied by about 20 mm, the width being between 3 and 5 mm. The lobes were found in the vicinity of the first 3 or 4 tracheal rings. Gross changes were revealed in three animals only. The thyroid gland in one male was enlarged to 50 mm because of both foci of lymphocytic infiltration and local amyloidosis within its parenchyma. Due to a weight increase up to 4.8 g this case was not involved in the mean mass evaluation. The thyroid gland of another male reached 30 mm and was of a very dark colour. The thyroid gland of one female was also enlarged to 30 mm.

LT was histologically revealed in 92 males and 88 females. The mean mass of thyroid glands in animals with LT (Fig. 1) was stated to be 1.3 ± 0.4 g for males (minimal 0.7 g, maximal 2.2 g) and 1.3 ± 0.3 g for females (minimal 0.8 g, maximal 2.2 g). The thyroid gland was not weighed in 17 males and 22 females.

The characteristic finding in LT was the presence of lymphocytic infiltrations, varying in range, predominantly within the glandular stroma (Fig. 2). Except for lymphocytes, in many cases the infiltration was composed of varying amounts of plasma cells (Fig. 3) and focally found neutrophilic granulocytes (Fig. 4). Independently of their range, infiltrations sometimes oppressed or destroyed the gland follicles (Fig. 5) and lymphocytes invaded inwards follicles and occurred within the colloid (Fig. 6). In follicles the macrophages



1. Mean mass of thyroid gland related to lymphocytic thyroiditis

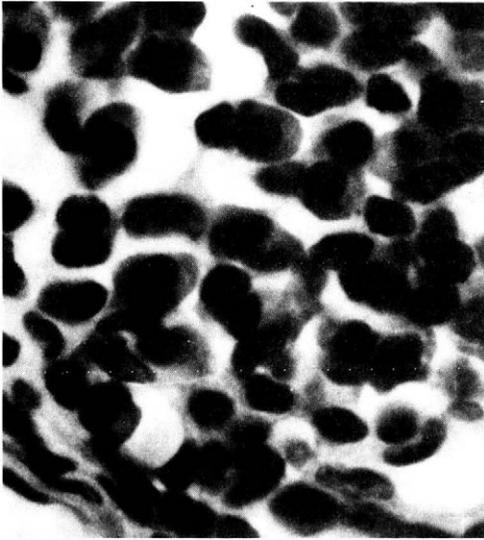


2. Lymphocytic infiltrations within the thyroid gland; HE, 20x

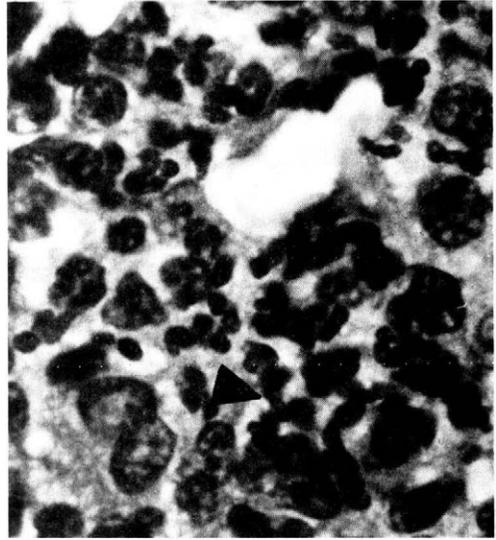
with phagocytized colloid were also found (Figs. 7, 8). These cells occurred in the form of large pale elements with indented nuclei and PAS-positive substance in their cytoplasm. The phagocytic response was also raised by the colloid prolapsed out of damaged follicles. This event was usually accompanied by a neutrophilic granulocyte reaction. The infiltrations rarely involved the gland capsule and never invaded the parathyroid or the surrounding adipose tissue. The frequency of histological findings is given in Fig. 9.

Table I shows the classification of the histopathologic picture according to the degree of involvement of the thyroid glands. The highest degrees of involvement were not found in animals younger than 12 months and in those older than 3 years (Fig. 10).

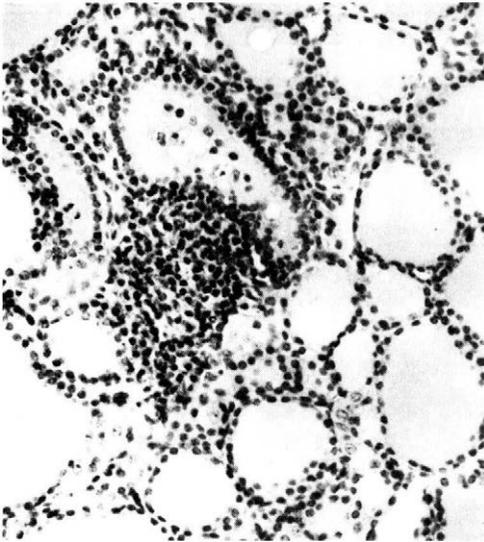
Only in one case (a male of 18 months, involvement degree ++++) the focal Graves-like hyperplasia of folli-



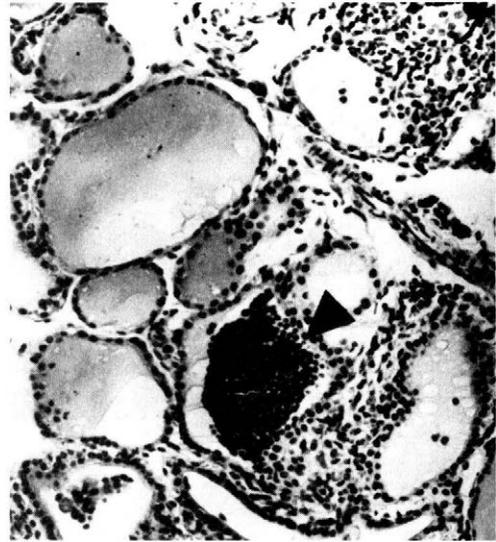
3. Infiltration consisting of plasma cells; HE, 100x



4. Local accumulation of neutrophilic granulocytes (arrowhead); HE, 100x



5. The damaged thyroidal follicle; HE, 20x



6. Lymphocytes (arrowhead) within a follicle; HE, 20x

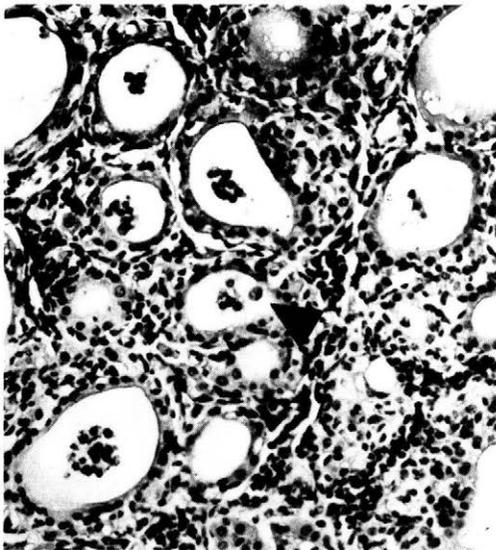
cular epithelia was revealed. In some follicles the epithelium was high columnar and remarkably light.

In another case (a male of 24 months) focal lipomatous atrophy of the thyroid parenchyma without the presence of any infiltrations was found in one lobe (Fig. 11).

Independently of the degree of gland involvement, the focal hyperplasia of parafollicular cells (Figs. 12,

13) occurred in 107 cases (59.4% of LT positive), i. e. in 56 males (60.9%) and 51 females (58.0%).

Frequently we found the calcification of the colloid (Fig. 14) occurring in the form of basophilic spheric formations. Their sizes varied from very minute to occupying as much as one third of the follicle area. This finding was revealed in 57 cases, i. e. in 32.0% of LT positive ones (32 males, 34.8%; 25 females, 28.4%).



7. Macrophages (arrowhead) within the colloid; PAS method, 20x

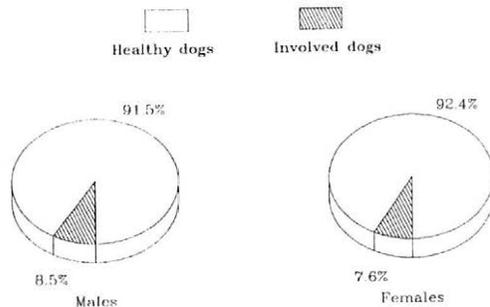


8. A macrophage within the colloid; PAS method, 100x

I. Classification of the histopathologic picture of thyroid gland lesions

Classification		Qualitative features in individuals						
Involved area	Degree	infiltrates			germinal centers	appression or destruction of follicles	colloid phagocytosed	neutrophilic granulocytes
		focal	focal-diffuse	diffuse				
up to 25%	+	yes			28.4%	scanty	36.7%	3.7%
up to 50%	++	yes	yes		74.2%	scanty	87.1%, focally	
up to 75%	+++		yes		57.1% karyothexis	focal	100%	focally
over 75%, never 100%	++++		yes	yes	similar to +++	regular	100%	focally

- + 1st degree
- ++ 2nd degree
- +++ 3rd degree
- ++++ 4th degree



9. Occurrence of lymphocytic thyroiditis in a Beagle dog breeding colony

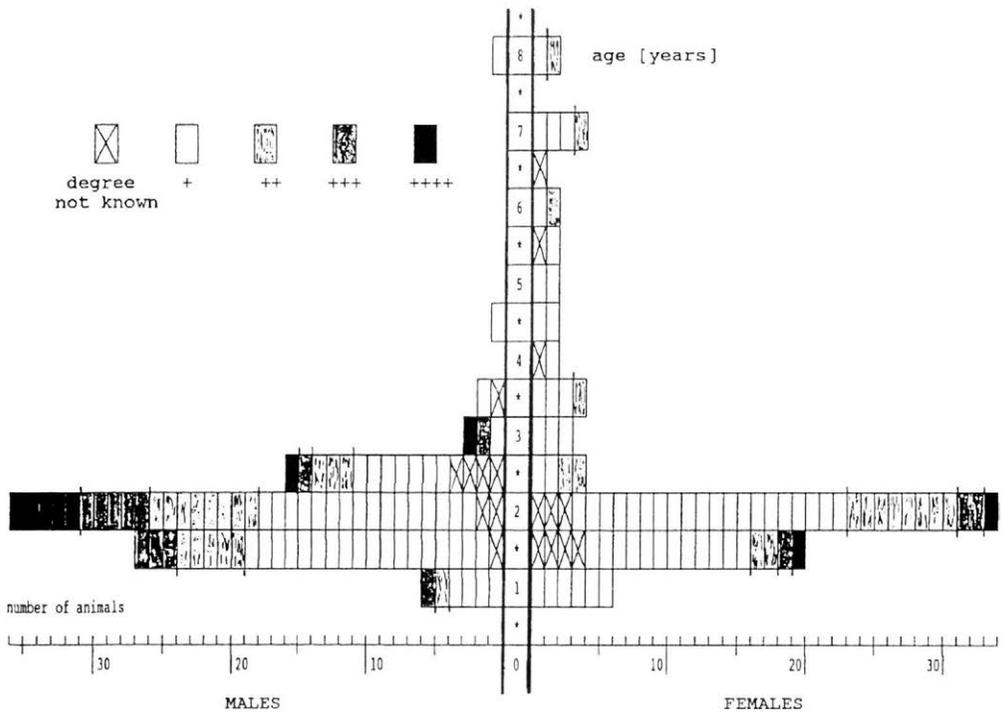
The abundant fibroproduction was never found (Fig. 15).

DISCUSSION

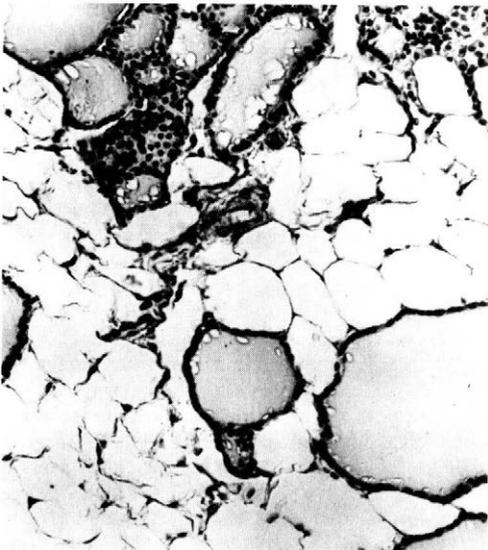
According to Tucker (1962) none of the clinical signs observed in any dog could be attributed to disordered function of the thyroid gland.

The mean mass of thyroid glands with LT exceeded the mean referential mass (Němec and Vortel, 1981) by about 10% in males and 21% in females.

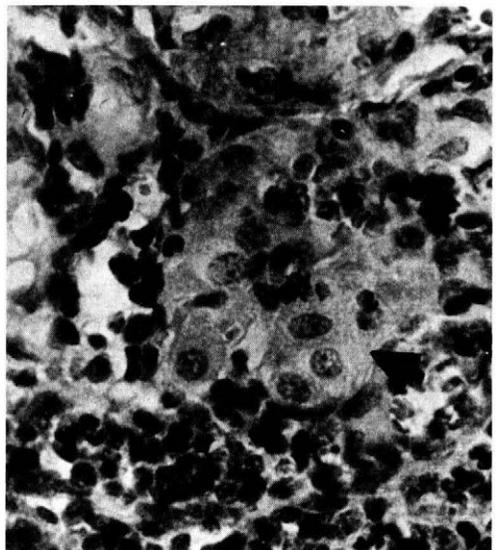
The histological picture of our LT cases corresponded almost identically to that given by Tucker (1962), Mawdesley-Thomas and Jolly (1967) and Beierwaltes and Nishiyama (1968). The detailed description led to creation of the



10. Number and age of animals with the histopathological evidence of lymphocytic thyroiditis



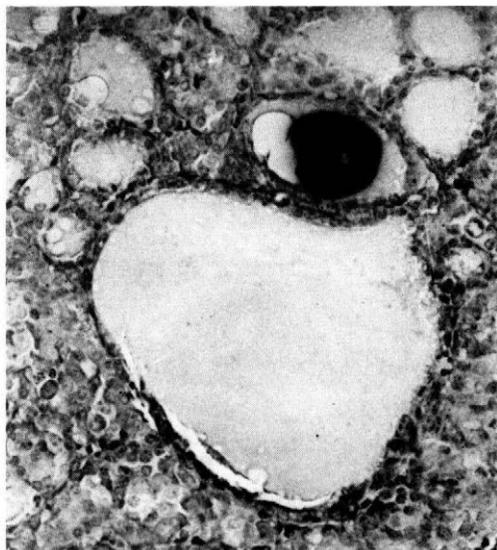
11. Lipomatous atrophy of one thyroidal lobe; HE, 20x



12. Focal hyperplasia of parafollicular cells (arrowhead); Cresyl violet, 40x



13. Focal hyperplasia of parafollicular cells (arrowhead); Grimelius' method, 100x



14. The local calcification of the colloid; Kossa's method, 20x



15. The thyroid gland with lymphocytic infiltration; Gomori's method, 20x

5-degree (0 to +++) qualitative evaluation of histological changes. We never found the Hürthle cells, described by Tucker (1962) and Beierwaltes and Nishiyama (1968). The idiopathic follicular atrophy of the thyroid gland, described by Gosselin et al. (1982), was revealed as the only suspect case in our collection. Fibrosis with proliferation of adipose tissue without the presence of any colloid, as described by

Conaway et al. (1985), did not occur in our material. This was not a surprising finding as Conaway et al. (1985) dealt with animals of a natural life span.

We stated the frequency of LT as being rather lower than that documented by Musser and Graham (1968), Beierwaltes and Nishiyama (1968) and Fritz et al. (1970) for closed breeding colonies and by Tucker (1962) for an experimental group. This may be caused by the partially open turnover of the observed colony. On the other hand, the extremely high frequency, mentioned by Fritz et al. (1970), could be related to the high level of inbreeding in the described colony. The sex of the animal did not affect the frequency of LT occurrence which also accorded with the data reported by the above mentioned articles. We could take the age of 6 months as the limit under which this lesion was not evidenced. The upper limit, the age when the process became extinct (Nožička, 1968), was impossible to determine.

We suspect our cases of the autoimmune origin, the evidence will be given in the following study.

In the dogs hyperplasia of parafollicular cells occurred parallelly but independently of the LT degree, although Mawdesley-Thomas and Jolly (1967) implied that it was coupled with a higher degree of involvement. Libbey et al. (1989) and Livolsi (1990) also considered parafollicular cell hyperplasia to be a common finding in men. Our observation of this phenomenon in almost 60% of the animals with LT supported their opinion. The sex of the animals did not affect the occurrence of the finding, either.

The findings of colloid calcification were not referable to LT, either.

REFERENCES

- BEIERWALTES, W. H. – NISHIYAMA, R. H. (1968): Dog thyroiditis: Occurrence and similarity to Hashimoto's struma. *Endocrinology*, *83*, 501–508.
- CONAWAY, D. H. – PADGETT, G. A. – BUNTON, T. E. – NACHREINER, R. – HAUPTMAN, J. (1985): Clinical and histological features of primary progressive, familial thyroiditis in a colony of Borzoi dogs. *Vet. Pathol.*, *22*, 439–446.
- FRITZ, T. E. – ZEMAN, R. C. – ZELLE, M. R. (1970): Pathology and familial incidence of thyroiditis in a closed Beagle colony. *Exp. Mol. Pathol.*, *12*, 14–30.
- GOSELIN, S. J. – CAPEN, C. C. – MARTIN, S. L. – KRAKOWKA, S. (1982): Autoimmune lymphocytic thyroiditis in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *3*, 185–201.
- HARACH, H. R. (1993): Palpation thyroiditis resembling C cell hyperplasia. *Path. Res. Pract.*, *189*, 488–490.
- HOTTENDORF, G. H. – HIRTH, R. S. (1974): Lesions of spontaneous subclinical disease in Beagle dogs. *Vet. Pathol.*, *11*, 240–258.
- LIBBEY, N. P. – NOWAKOWSKI, K. J. – TUCCI, J. R. (1989): C cell hyperplasia of the thyroid in a patient with goitrous hypothyroidism and Hashimoto's thyroiditis. *Am. J. Surg. Pathol.*, *13*, 71–77.
- LIVOLSI, V. A. (1990): Pathology of thyroid disease. In: FOLK, S. A. (ed.): *Thyroid Disease: Endocrinology, Surgery, Nuclear Medicine, and Radiotherapy*. New York, Raven Press, pp. 127–175.
- LOMBARDI, A. – SANTINI, F. – BASSI, P. – GIUSTI, F. L. – TONACCHERA, M. – CUCCHI, P. – TOSTI BALDUCCI, M. – GRZYCZYNSKA, M. – CHIOVATO, L. – VITTI, P. – MARCOCCI, C. – MARIOTTI, S. – LOPEZ, G. – FENZI, G. F. – PINCHERA, A. (1988): Effects of circulating antibodies in autoimmune thyroid disease. In: MAGGI, M. – JOHNSTON, C. A. (eds.): *Horizons in Endocrinology*. 52, New York, Raven Press, pp. 209–219.
- MARIOTTI, S. – CHIOVATO, L. – VITTI, P. – MARCOCCI, C. – FENZI, G. F. – DEL PRETE, G. F. – TIRI, A. – ROMAGNANI, S. – RICCI, M. – PINCHERA, A. (1989): Recent advances in the understanding of humoral and cellular mechanisms implicated in thyroid autoimmune disorders. *Clin Immunol. Immunopathol.*, *50*, 574–584.
- MAWDESLEY-THOMAS, L. E. (1968): Lymphocytic thyroiditis in the dog. *J. Small. Anim. Pract.*, *9*, 539–550.
- MAWDESLEY-THOMAS, L. E. – JOLLY, D. W. (1967): Autoimmune disease in the Beagle. *Vet. Rec.*, *80*, 553–554.
- MUSSER, E. – GRAHAM, W. R. (1968): Familial occurrence of thyroiditis in purebred Beagles. *Lab. Anim. Care*, *18*, 58–68.
- NĚMEC, J. – VORTELOVÁ, V. (1981): Absolute and relative organ weights of the beagle dog. *Z. Versuchstierk.*, *23*, 333–336.
- NOZIČKA, Z. (1968): Příspěvek k objasnění vztahu mezi morfológickými změnami orgánů a výskytem protiorgánových protilátek v séru zemědělných. *Katedra patologické anatomie LF UK, Hradec Králové*, 107 s.
- SCARLETT, J. M. (1994): Epidemiology of thyroid diseases of dogs and cats. *Vet. Clin. NA Small Anim. Pract.*, *24*, 477–486.
- TUCKER, W. E. (1962): Thyroiditis in a group of laboratory dogs. A study of 167 Beagles. *Amer. J. Clin. Pathol.*, *38*, 70–74.

Received: 96-06-26

Accepted after corrections: 96-08-27

Contact Address:

MVDr. Luděk Vajner, CSc., Ústav histologie a embryologie 2. lékařské fakulty UK, V úvalu 84, 150 18 Praha 5-Motol, Česká republika,
Tel. 02/24 43 59 82, fax 02/24 43 58 20, e-mail: Ludek.Vajner@lfmotol.cuni.cz

V roce 1997 vyjde
rozšířené a modernizované vydání stejnojmenné
publikace z roku 1988

PŘIROZENÉ ŠKODLIVÉ LÁTKY V ROSTLINNÝCH KRMIVECH

P. Kalač – V. Míka

Zdravotní stav a užitkovost hospodářských zvířat jsou nepříznivě ovlivňovány škodlivými látkami, které si rostliny vytvářejí pro svou ochranu jako tzv. přirozené pesticidy. Jedná se např. o glukosinoláty a další glykosidy, fytoestrogeny, alkaloidy, saponiny, toxické aminokyseliny a bílkoviny, třísloviny a řadu dalších látek. Kniha shrnuje soudobé poznatky o jejich chemické podstatě, výskytu, faktorech ovlivňujících obsah, účincích na hospodářská zvířata a o možnostech omezení jejich nepříznivých vlivů.

Publikace je určena šlechtitelům, agronomům, zootechnikům, veterinárním lékařům, pracovníkům zemědělského výzkumu a státní správy a rovněž učitelům a studentům zemědělských škol.

Rozsah asi 400 stran, předpokládaná cena 160 až 190 Kč.

Objednávky zasílejte na adresu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací

Referát odbytu

Slezská 7

120 56 Praha 2

Tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38

THE EFFECTIVENESS OF INACTIVATED, PURIFIED AND CONCENTRATED EXPERIMENTAL RABIES VACCINE FOR VETERINARY USE: IMMUNOGENIC ACTIVITY

ÚČINNOST INAKTIVOVANÉ, PURIFIKOVANÉ A KONCENTROVANÉ VAKCÍNY PROTI VZTEKLINĚ PRO VETERINÁRNÍ POUŽITÍ: IMUNOGENNÍ AKTIVITA

J. Süliová, Z. Beníšek, Š. Švrček, A. Ďurove, R. Ondrejka

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The authors prepared an experimental, inactivated, concentrated and highly purified rabies vaccine from the strain Vnukovo-32/107. The purification and concentration (simultaneous – in one operation) was carried out by affinity chromatography. The content of rabies antigen in the vaccine was 4.256 UE/cm³ (determined by ELISA method). The authors used their own lipid adjuvant – type oil in water – to resolve the lyophilized vaccine to original volume. It is based on esters of fatty acids. The effectiveness – immunogenic activity – of the experimental preparation was compared with that of commercial rabies vaccines and the reference vaccine by means of the NIH and NRLR methods. The results obtained (2.826 units/cm³ by the NIH and 3.085 units/cm³ by the NRLR method) confirmed that the method of affinity chromatography could be used to prepare a rabies vaccine, exhibiting effectiveness superior to commercial preparations available, and complying with the WHO criteria.

rabies; rabies vaccine; immunogenic activity; NIH method; NRLR method; lipid adjuvant

ABSTRAKT: Autori pripravili experimentálnu inaktivovanú, koncentrovanú a purifikovanú antirabickú vakcínu z kmeňa Vnukovo-32/107. Na purifikáciu a koncentráciu (súčasne, jednou operáciou) využili metódu afinitnej chromatografie. Vakcína po koncentracii obsahovala 4,3 IU/cm³ rabického antigénu (stanovené metódou ELISA). Na zvýšenie účinnosti tejto vakcíny použili vlastné lipidné adjuvans typu olej vo vode, na báze esterov masných kyselín, ktorým bola lyofilizovaná vakcína pred použitím resuscitovaná na pôvodný objem. Sledovali účinnosť – imunogénnu aktivitu experimentálneho preparátu a porovnali ho s komerčnými antirabickými vakcínami a referenčnou vakcínou pomocou metódy NIH a NRLR. Získané výsledky (2,826 jednotiek/cm³ metódou NIH a 3,085 jednotiek/cm³ metódou NRLR) potvrdili, že afinitnou chromatografiou je možné pripraviť antirabickú vakcínu, ktorá svojou účinnosťou predčí komerčné preparáty a vyhovuje kritériám WHO.

besnota; antirabická vakcína; imunogénna aktivita; NIH-metóda; NRLR-metóda; lipidné adjuvans

INTRODUCTION

Rabies is considered as one of the most important viral zoonoses. On a worldwide scale, mainly in the developing countries, approximately 60 000 people die of rabies every year and post-exposure immunization is indicated in other several millions (Krebs et al., 1995). The number of cases of animal rabies is difficult to assess (Animal Health Yearbook, 1995; Rabies Bulletin Europe WHO, 1995). The costs of thorough prevention and control of this dangerous infection in industrialized countries have been considerable. Rather dangerous situation has arisen in the developing countries which lack the material, personnel, and infrastructure for realization of effective anti-infection programmes.

Owing to good cooperation of veterinary and human health services in industrialized countries, despite con-

stantly unfavourable epizootiological situation, the cases of human rabies occur in these countries only sporadically (Krebs et al., 1995). Rabies occurs in a sylvatic form in animals; rabies of pet and farm animals is relatively well controlled. This results from the complex approach to the prevention and control of rabies in these countries. In this process, the immunoprophylaxis of rabies in pet animals is of decisive importance (pre-exposure vaccination of domestic dogs and cats and vaccination of farm animals on pasture in infected areas). At present, inactivated, adjuvanted cell-culture rabies vaccines are mostly used for this purpose round the world. Neither inactivated, concentrated and highly purified nor recombinant rabies vaccines intended for parenteral application are manufactured because of their high price.

A rational, simple, and inexpensive technological procedure – affinity chromatography method – was

used to prepare a concentrated and highly purified rabies vaccine. Its effectiveness was determined by two parallel, strictly quantitative procedures. The immunogenic activity of this vaccine was investigated and compared with the commercial preparations of different origin.

Comparative experiments were aimed at the preliminary evaluation of the effectiveness (immunogenic activity) of the experimental vaccine prepared in our laboratory, and of commercial vaccines, in model experiments on mice. The evaluation by means of the methods NIH (Seligmann, 1973) and NRLR (National Reference Laboratory of Rabies, Slovakia), (Švrček and Vrťiak, 1980), was carried out in parallel.

MATERIAL AND METHODS

VACCINES

Experimental vaccine prepared in our laboratory

This vaccine was prepared using Vnukovo-32/107 strain, suitable at titres higher than $4.0 \log \text{MICLD}_{50}/0.03 \text{ cm}^3$ as a vaccination strain (Selimov et al., 1977). The cultivation was carried out in a cell line BHK-21/13S, in a cultivation medium MEM (ÚSOL, Prague, Czech Republic), supplemented with 2% inactivated calf serum for cell cultures (Bioveta, Ivanovice na Hané, Czech Republic).

The viral suspension obtained (virus titre $4.86 \log \text{MICLD}_{50}/0.03 \text{ cm}^3$) was inactivated with cyclic ethyleneimine (starting substance bromo-2-ethylenamine bromohydrate, Merck-Schuchardt, Germany). The inactivation process took place at a laboratory temperature for 18 hours. The completeness of the inactivation was checked by injecting the inactivated and diluted (1 : 10) viral suspension to mice of body weight 6 grammes, intracerebrally (*i.c.*). The volume of the inoculum was 0.03 cm^3 . Mice were observed for 21 days.

The quantity of the rabies antigen present in the inactivated viral suspension was determined by means of an ELISA technique (van der Marel and van Wezel, 1981). If the titre of the inactivated virus was higher than $1.0 \text{ UE}/\text{cm}^3$ (unit equivalents/ cm^3), we proceeded to the concentration and purification of the viral suspension.

A method of affinity chromatography (Sakamoto et al., 1986) on sulphated cellulose was used to concentrate and purify the inactivated rabies virus. The sulphated cellulose was prepared by means of a sulphonation method using chlorosulphonic acid (HSO_3Cl , Merck, Germany). Cellulose made in the Czech Republic was used – Perloza St Medium (Severočeské chemické závody, Lovosice, Czech Republic). The presence of proteins in individual fractions was observed by means of a flow-through UV-detector, at 280 nm

(Pharmacia, Sweden). The rabies antigen was detected in selected fractions by means of an indirect immunofluorescence method (Dean and Abelsbeth, 1973). The amount of antigen in these fractions was determined by ELISA method (van der Marel and van Wezel, 1981). The fractions with the highest content of antigen ($1.46\text{--}8.64 \text{ UE}/\text{cm}^3$) were pooled and dialysed against 0.01 M PBS buffer. The purity of the preparation obtained was examined electrophoretically using an apparatus Phastsystem (Pharmacia, Sweden). A Lowry method (Lowry et al., 1951) was employed for determination of the concentration of viral proteins. Lyophilisation of the vaccine was carried out using a lyophilisation medium composed of saccharose and gelatin.

In order to increase the effectiveness of the vaccine, a lipid adjuvant of the type oil in water, based on fatty acid esters (Beníšek et al., 1992), was used to resolve the lyophilized vaccine to the original volume.

Commercial vaccines used for comparison

- Tissue rabies vaccine (live), op. No. 960291 (producer Bioveta Ivanovice na Hané, Czech Republic);
- Tissue rabies vaccine, inactivated (adsorbed to $\text{Al}(\text{OH})_3$ gel), op. No. V 060291 (producer Bioveta Ivanovice na Hané, Czech Republic);
- Inactivated rabies vaccine (adsorbed to $\text{Al}(\text{OH})_3$ gel), named RABISIN, op. No. 00C321 (producer Rhône-Mérieux, France).

Standard international vaccine –

reference vaccine with the content of antigen $16 \text{ IU}/\text{cm}^3$ (international units per 1.0 cm^3) (Statens Seruminstytut, Copenhagen, Denmark).

EXPERIMENTAL ANIMALS

Random-bred, white mice from VELAZ-Prague (Czech Republic), weighing 12 or 18 grammes, were used in the experiments.

DETERMINATION OF IMMUNOGENIC ACTIVITY OF THE VACCINES

NIH method (Seligmann, 1973)

Each of the dilutions (1 : 25, 1 : 125, 1 : 625, 1 : 3125, with experimental and commercial vaccines, or 1 : 25, 1 : 125, 1 : 625, 1 : 3125, 1 : 15625, 1 : 78125 with the reference vaccine) prepared from the vaccines mentioned above, was used to immunize 12 mice of body weight 12 g, intraperitoneally (*i.p.*). The mice were inoculated twice within a 7-day interval. The vo-

lume of inoculum was 0.5 cm³. On day 14 after the first immunization the vaccinated mice were challenged intracerebrally (*i.c.*) with virus fixe, strain CVS (titre 5.4 log MICLD₅₀/0.03 cm³), at a dose 25 MICLD₅₀/0.03 cm³.

The assessment of the effectiveness of the vaccines tested was carried out by a volumetric method (Seligmann, 1973). By this method, we determined the highest dilution (ED₅₀) of the reference and tested vaccines which protected 50% of mice against the *i.c.* challenge with virus fixe, strain CVS. The effectiveness of the vaccine tested was calculated as a ratio of ED₅₀ of the reference vaccine and ED₅₀ of the tested vaccine. The known concentration of the reference vaccine, expressed in international units, was used to determine, by additional calculations, the number of international units per 1.0 cm³ of the vaccine tested.

NRLR method (Švrček and Vrtiak, 1980)

Each of the dilutions of the tested vaccines was used to immunize 5 mice, weighing 12 g, subcutaneously (*s.c.*) into the upper lip. The volume of the inoculum used was 0.2 cm³. On day 21 after the vaccination, the mice were challenged *s.c.* with virus fixe, strain CVS (titre 5.4 log MICLD₅₀/0.03 cm³). The dose 2.1 MSCLD₅₀/0.1 cm³ was injected into the upper lip of the animals. The titre was determined beforehand, in a preliminary experiment, using the method of *s.c.* infection of 18 g intact mice. Control titration of the strain CVS was carried out in parallel with the challenge of the vaccinated mice. The ED₅₀ value was calculated according to Reed and Muench (1938). The effectiveness of the vaccine was calculated in international units using the same approach as that in the NIH method.

RESULTS

The data on the content of live or inactivated rabies virus (antigen) in the initial suspension, in fractions during vaccine preparation, as well as in the final product are shown in Tab. I.

The immunogenic activity of the experimental vaccine was superior to the commercial preparations used (Tabs. II and III). Its effectiveness was more than

3-fold higher (3.3 with the NIH method and 3.1 with the NRLR method) in comparison with the live commercial rabies vaccine (Tab. IV). The effectiveness of the inactivated commercial vaccine of Czech origin also lags behind the effectiveness of the experimental preparation (1.145 units/cm³ – NIH method and 1.311 units/cm³ – NRLR method; Tabs. II and III). Noteworthy is the relatively lower effectiveness of the French commercial vaccine RABISIN (1.792 units/cm³ – method NIH and 2.066 units/cm³, method NRLR; Tabs. II and III).

The results obtained by the NRLR method are in correlation with the results of the NIH test. From the point of view of its immunogenic activity, the experimental vaccine more than sufficiently meets the requirements of WHO (1992), posed on veterinary rabies vaccines – a minimum of 1.0 unit per 1 vaccination dose, at the assumed volume of the vaccine dose 1.0 cm³ for all target animals at subcutaneous (*s.c.*) or intramuscular (*i.m.*) application; it exceeds approx. 3-fold the minimum required value.

DISCUSSION

There are a large number of rabies preparations used in veterinary medicine with more or less success (WHO, 1992). Since the Pasteur (1885) every efforts have been made in the field of rabies immunoprophylaxis to develop effective and safe rabies vaccines. This development started with the preparation of partially inactivated vaccines from the nervous tissue (Fermi type vaccines), continued through totally inactivated vaccines, also from the nervous tissue (Semple type vaccines), and led to the vaccines from modified live viruses – embryonic or cellular vaccines, and finally to the vaccines inactivated, prepared in cell cultures, as well as those obtained from the brains of the young animals (lambs, suckling mice, etc.) – WHO (1992). Nowadays, all types of rabies vaccines mentioned are produced and used round the world, accordingly for which type of vaccine the relevant country will decide. The requirements for high effectiveness, safety, and areatogenicity of the vaccine are only fulfilled by those rabies vaccines which are produced in cell cultures.

I. Data concerning the content of rabies antigen during the preparation of the vaccine

Titre of the initial infectious suspension	4.86 log MICLD ₅₀ /0.03 cm ³	(A)
Content of rabies antigen in the inactivated virus suspension	1.173 UE/cm ³	(B)
Content of rabies antigen in fractions after chromatographic separation	1.146-8.64 UE/cm ³	(B)
Concentration of proteins in vaccine	4.012 mg/cm ³	(C)
Content of rabies antigen in the vaccine	4.256 UE/cm ³	(B)

UE = unit equivalents

A = titration in mice

B = ELISA method

C = Lowry method

II. Determination of immunogenic activity of experimental and commercial rabies vaccines and designation of efficiency in international units by means of NIH-method

Vaccine	ED ₅₀ (mm ³)	units/cm ³
Experimental vaccine	4.102.10 ⁻⁴	2.826
Tissue rabies commercial live vaccine	1.352.10 ⁻³	0.857
Tissue rabies commercial inactivated vaccine	1.012.10 ⁻³	1.145
Commercial vaccine Rabisin	6.468.10 ⁻⁴	1.792
Reference vaccine	7.244.10 ⁻⁵	16.000

ED₅₀ = effective dose 50

III. Determination of immunogenic activity of experimental and commercial rabies vaccines and designation of efficiency in international units by means of NRLR-method

Vaccine	ED ₅₀ (mm ³)	units/cm ³
Experimental vaccine	3.757.10 ⁻⁴	3.085
Tissue rabies commercial live vaccine	1.157.10 ⁻³	1.002
Tissue rabies commercial inactivated vaccine	8.841.10 ⁻⁴	1.311
Commercial vaccine Rabisin	5.610.10 ⁻⁴	2.066
Reference vaccine	6.067.10 ⁻⁵	16.000

ED₅₀ = effective dose 50

IV. Comparison of experimental vaccine with commercial ones – ratio of international units per 1.0 cm³

Ratio of units/cm ³	Method NIH	Method NRLR
Exp/Live	3.298	3.079
Exp/Inact	2.468	2.353
Exp/Rab	1.577	1.493

Exp = experimental vaccine

Live = tissue commercial live vaccine

Inact = tissue commercial inactivated vaccine

Rab = commercial vaccine Rabisin

According to the WHO recommendations (1984, 1992), the live rabies vaccines, used in animal immunoprophylaxis, should be replaced by inactivated vaccines. It is obvious that a suitable adjuvant should be used to potentiate their immunogenic activity. The conventional mineral oils, used originally as a component of oil adjuvant of the type of Freund incomplete adjuvant, induce anaphylactoid reactions in some immunized animals (Krejčí et al., 1988). Because of that, aluminium hydroxide has become again the sole substance used for potentiation of the effectiveness of veterinary vaccines. However, besides the lower effectiveness of this substance in some recipients (cats), it can induce fibrosarcoma when applied subcutaneously (Hendrick and Brooks, 1994). This supports the hypothesis that the persistent inflammatory and immunologic reactions to aluminium adjuvants induce continued proliferation of resident mesenchymal cells that may lead to neoplastic transformation of these cells in

some cases. As for the effectiveness as well as the practical use in veterinary medicine, very prospective from among different adjuvants is the emulsion oil in water, based on esters of fatty acids (Bomford, 1881). These esters are metabolizable and induce neither total nor local reactions (Beníšek et al., 1992).

Another possible way of increasing the effectiveness of veterinary rabies vaccines is their concentration and purification by a suitable method. The following concentration and purification procedures are the most frequently used ones: by means of polyethylene glycol (PEG) (Mikhalowski et al., 1971; Atanasiu and Perrin, 1979), ethylene polyoxide (POE), or by ultrafiltration (van der Marel and van Wezel, 1978; Panon and Atanasiu, 1980), gel filtration (van der Marel and van Wezel, 1978), zonal centrifugation (Lavender and van Frank, 1971; Atanasiu et al., 1977; Majer et al., 1977) or ultracentrifugation (Sokol, 1973). Sakamoto et al. (1986) used affinity chromatography to purify and, at the same time, to concentrate rabies virus. This rational and undemanding procedure allows to carry out the purification and concentration of the viral suspension simultaneously, which considerably decreases the costs of production of the vaccine. In this way, a large amount of highly purified and concentrated rabies vaccine of high effectiveness may be produced and also used in veterinary practice. El-Karamany (1987) prepared a rabies vaccine in Vero cells using the strains Pittmann-Moore (PM) and Pasteur, which were concentrated by ultrafiltration and purified by gel filtration. An exceptionally potent vaccine of value 9.4 units/cm³, determined by the NIH test, was obtained

only from the Pasteur strain. The vaccine from the PM strain exhibited lower immunogenic activity – 1.8 units/cm³. Both vaccines were subjected to 40-fold concentration. Demetradze and Safarov (1991) prepared a concentrated cellular inactivated rabies vaccine, the immunogenic activity of which reached 2.0 units/cm³ according to the NIH method. Our experimental vaccine exhibited immunogenic activity of 2.826 units/cm³ (NIH test) at 4-fold concentration only.

Our results prove that the method of affinity chromatography is one of the suitable procedures of preparation of highly potent rabies veterinary vaccines. In view of the effective method of adsorbing the rabies virus from the infectious medium by affinity chromatography, this technological procedure is also suitable for processing the infectious media with lower content of this virus. The virus yield reached in our laboratory was close to 80%. Sakamoto et al. (1986) reported the yield as high as 90%.

The WHO requirement (1992) – a minimum of 1 unit per vaccination dose – has been exceeded with the experimental vaccine produced in our laboratory. The use of this vaccine allows to minimize the vaccination dose (volume) for target animal species or to use other than the conventional way of administration (e.g. intradermal). Results of the experiments aimed at this goal and carried out in target animal species will be presented in the second part of our study.

REFERENCES

ANIMAL HEALTH YEARBOOK 1994 (1995): FAO, WHO, OIE, WELTE, V. R. (ed.), Rome.

ATANASIU, P. – TSIANG, H. – RECULARD, P. – AGUILON, F. – LAVERGNE, M. – ADAMOVICZ, Ph. (1977): Zonal centrifuge purification of human rabies vaccine obtained on bovine foetal kidney cells. Biological results. WHO/IABS Symposium on the standardization of rabies vaccines for human use produced on tissue culture. *Develop. Biol. Standard.*, 40, 35–44.

ATANASIU, P. – PERRIN, P. (1979): Microméthode immunoenzymatique de titrage des anticorps antirabiques; utilisation de la glycoprotéine rabique et de la protéine A conjuguée à la peroxydase. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 130 A, 257–268.

BENÍŠEK, Z. – SŮLIOVÁ, J. – ŠVRČEK, Š. – ZÁVADOVÁ, J. – ĐUROVE, A. – HŮSKA, M. – ONDREJKA, R. – MANDELÍK, M. – PAULÍK, Š. – TAKÁČOVÁ, D. – MOJŽIŠOVÁ, J. – PAUER, T. (1992): Technologická příprava, overenie účinnosti a neškodnosti inaktivovanej adjuvantnej antirabickéj vakcíny. In: Zbor. Abstr. z 19. zjazdu Čsl. spol. mikrobiol. pri ČSAV, 23 s.

BOMFORD, R. (1981): The adjuvant activity of fatty acid esters. The role of acyl chain length of saturation. *Immunology*, 44, 187–192.

DEAN, D. J. – ABELSETH, M. K. (1973): The method of immunofluorescence. In: KAPLAN, M. – KOPROWSKI, H.

(eds.): *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd ed. Geneva, WHO, pp. 73–84.

DEMETRADZE, L. G. – SAFAROV, L. K. (1991): Rezultaty ispytaniya kulturnoj antirabicheskoj vakciny. *Veterinarija*, 7, 24–26.

EL-KARAMANY, R. M. (1987): Production in Vero cells of an inactivated rabies vaccine from strain FRV/K for animal and human use. *Acta Virol.*, 31, 321–328.

HENDRICK, M. J. – BROOKS, J. J. (1994): Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunochemistry. *Vet. Pathol.*, 31, 126–129.

KREBS, J. W. – WILSON, M. L. – CHILDS, J. E. (1995): Rabies. Epidemiology, prevention and future research. *J. Mammol.*, 76, 681–694.

KREJČÍ, J. – TOMAN, M. – PINKA, K. – JURÁK, E. – MENŠÍK, P. – POLÁČEK, R. (1988): Dosažené poznatky o anafylaktoidních reakcích skotu. [Dílčí správa z úkolu P-06-329-809.] Brno, VÚVeL, 35 s.

LAVENDER, J. F. – FRANK van, R. M. (1971): Zonal centrifuged purified duck embryo cell culture rabies for human vaccination. *Appl. Microbiol.*, 22, 358–365.

LOWRY, O. H. – ROSEBROUGH, N. J. – FARR, A. L. – RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 256–272.

MAJER, M. – HILFENHAUS, J. – MAULER, R. – HENNESSEN, W. (1977): Zonal centrifuged human diploid cell rabies vaccine. *Develop. Biol. Standard.*, 37, 262–271.

MAREL van der, P. – WEZEL van, A. L. (1978): Isolation of biologically active components from rabies and other envelope viruses. *Develop. Biol. Standard.*, 42, 93–98.

MAREL van der, P. – WEZEL van, A. L. (1981): Quantitative determination of rabies antigen by ELISA. *Develop. Biol. Standard.*, 50, 267–275.

MIKHALOWSKI, E. M. – TSIANG, H. – ATANASIU, P. (1971): Concentration du virus rabique par le polyéthylène glycol. *Ann. Inst. Pasteur*, 121, 563–568.

PANON, G. – ATANASIU, P. (1980): Concentration and purification of human rabies vaccines. *Res. Develop. Biol. Standard.*, 46, 257–264.

PASTEUR, L. (1885): Méthode pour prévenir la rage après morsure. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 101, 765–772.

RABIES BULLETIN EUROPE (1995): Comp. and ed.: WHO Coll. Centre Rab. Sur. Res., Tübingen, 19, No. 2, 25 p.

REED, L. J. – MUENCH, H. A. (1938): Simple method for estimating 50% end points. *Amer. J. Hyg.*, 27, 493–497.

SAKAMOTO, K. – OHKUMA, K. – KAWAHARA, T. – SAKOH, M. (1986): A method for purification of rabies virus. *Eur. pat. appl.*, appl. No. 86110047-9, 13 p.

SELIGMANN, E. B. (1973): The NIH test for potency. In: KAPLAN, M. – KOPROWSKI, H. (eds.): *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd ed. Geneva, WHO, pp. 279–286.

SELIMOV, M. A. – ELBERT, L. B. – AKSENOVA, T. A. – KLJUJEVA, E. V. – GRIBENČA, J. F. – KONDRATIJEVA, N. L. (1977): Antigennaja aktivnost koncentrirovannoj i očiščennej kulturnoj antirabicheskoj vakciny iz štamma Vnukovovo-32-107. *Voprosy virusologii*, 21, 581–585.

SOKOL, F. (1973): Purification of rabies virus and isolation of its components. In: KAPLAN, M. – KOPROWSKI, H.

(eds.): Laboratory Techniques in Rabies. 3rd. ed. Geneva, WHO, pp. 165–178.

ŠVRČEK, Š. – VRTIAK, O. J. (1980): Modifikacija količestvennega metoda IPVZ dlja opredelenija imunogennoj aktivnosti antirabičeskych vakcin v opyte na myšach. Acta Vet. Sci. Hung., 20, 43–46.

WHO (1984): Expert committee on rabies. 7th Report. 78 pp.

WHO (1992): Expert committee on rabies. 8th Report. 87 pp.

Received: 96–07–29

Accepted: 96–08–28

Contact Address:

RNDr. Judita Šušliová, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/633 21 11–15, fax 095/76 76 75

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LYSSA VIRUS STRAINS FROM THE AREA OF ORAL ANTIRABIES VACCINATION IN SLOVAKIA

IZOLÁCIA A IDENTIFIKÁCIA LYSSAVÍRUSOVÝCH KMEŇOV Z OBLASTI VYKONANIA ORÁLNEJ ANTIRABICKEJ VAKCINÁCIE NA SLOVENSKU

R. Ondrejka, A. Ďurove, Š. Švrček, Z. Beníšek, J. Süliová

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The study was aimed at isolation and subsequent identification of strains of rabies virus by means of monoclonal antibodies from foxes killed in the vaccination zone within the complex preliminary monitoring of oral antirabies vaccination. The results obtained indicate that the vaccines for oral antirabies vaccination used in Slovakia did not contain any vaccination strain pathogenic to the extremely sensitive target species – the fox (*Vulpes vulpes*).

foxes; oral vaccination; isolation and identification of strain

ABSTRAKT: Práca bola zameraná na izoláciu a identifikáciu kmeňov vírusu besnoty pomocou monoklonálnych protilátok od líšok odlovených vo vakcinačnej zóne v rámci komplexného priebežného monitoringu orálnej antirabickéj vakcinácie. Z výsledkov vyplýva, že na Slovensku použité vakcíny pre orálnu antirabickú vakcináciu neobsahovali vakcinačný kmeň patogénny pre extrémne vnímavý cieľový druh – líšku obyčajnú.

líšky; orálna vakcinácia; izolácia a identifikácia kmeňov

ÚVOD

Nedeliteľnou súčasťou komplexu kontrolných terénnych a laboratórnych vyšetrení po vykonaní orálnej antirabickéj vakcinácie líšok je izolácia a identifikácia kmeňov vírusu besnoty od zvierat odlovených vo vakcinačnej zóne (Schneider a i., 1981, 1985; Cox a i., 1992; WHO, 1984). V našich podmienkach kontrolné vyšetrenia zamerané na priebežné hodnotenie neškodnosti a efektívnosti orálnej vakcinácie sa vykonávajú podľa záväzných metodických pokynov ŠVS SR (Štátnej veterinárnej správy Slovenskej republiky) v Bratislave (Švrček a i., 1994; Švrček, 1994). Tieto pokyny boli vypracované v zmysle príslušných doporučení, WHO a OIE. Priebežná identifikácia kmeňov vírusu besnoty izolovaných od líšok v zóne orálnej vakcinácie je nevyhnutná pre kontrolu reziduálnej virulencie vakcinačného kmeňa, jeho patogenity pre extrémne vnímavý druh – líšku obyčajnú. Pomocou panelu monoklonálnych protilátok (antinukleokapsidových) sa o.i. môžu rozlíšiť uličné kmene vírusu besnoty od vakcinačných (Schneider a i., 1985; Smith a Baer, 1988; Cox a i., 1992). V rokoch 1992 až 1993 bola vykonaná orálna antirabická vakcinácia líšok na Slovensku len na obmedzenom území, tri až sedem okresov. Rok 1994 bol prvým rokom vykonania celo-

plošnej orálnej antirabickéj vakcinácie v rámci trojročného koncepčného plánu (1994 až 1996), realizovaného ŠVS SR v Bratislave (Švrček a i., 1994; Ďurove a i., 1996).

V rokoch 1992, 1993, 1994 a 1995 na Slovensku pre orálnu imunizáciu boli použité vakcinačné návnady Kamark (Mevak a.s., Nitra, SR) na báze kmeňa Vnukovo-32/107. Zároveň pre jarnú vakcinačnú kampaň v roku 1994 boli použité návnady Lysvulpen (Bioveta, Ivanovice na Hané, ČR) na báze kmeňa SAD – Bern. Biologické vlastnosti horeuvedených kmeňov boli v poslednom období podrobne popísané (Dedek a i., 1993; Švrček a i., 1995a, b).

MATERIÁL A METÓDY

Vyšetrovaný materiál

Na izoláciu rabických kmeňov slúžili vzorky mozgu mladých líšok odlovených na Slovensku vo vakcinačných zónach v rokoch 1992 až 1995. Tieto boli odoberané v laboratóriách pre diagnostiku besnoty (LDB) ŠVÚ na Slovensku (LDB ŠVÚ Bratislava, Nitra, Zvolen, Dolný Kubín, Košice, Prešov) v prípade pozitívneho výsledku detekcie rabického antigénu (RA) priamou

metódou imunofluorescencie (PMIF) (Dean a Abels, 1973).

Izolačné pokusy

K izolačným pokusom boli použité hniezda „randobredných“ cicajúcich myši kmeňa ICR z chovu Velaz Praha, resp. Parazitologického ústavu SAV v Košiciach. Pre izoláciu každého kmeňa bolo použité jedno hniezdo myši (obyčajne 10 kusov).

Myši boli infikované metódou intracerebrálnej infekcie (Koprowski, 1973) supernatantom 10 % mozgovej suspenzie s prídavkom antibiotík; objem inokula 0,015 cm³. Zvieratá boli usmrtené v štádiu prostrácie a bola vykonaná parciálna pitva. Z transverzálnych rezov mozgu na úrovni hippokampov boli urobené otláčky, vysušené na vzduchu, fixované a farbené pomocou polyklonálneho antirabického konjugátu (Bioveta, Ivanovice na Hané, ČR); na dôkaz rabického antigénu. Pre izoláciu kmeňov vírusu besnoty slúžili vzorky CNS mladých líšok, odlovených vo vakcinačných zónach, kde v rokoch 1992, 1993, 1994 a 1995 bola vykonaná orálna antirabická vakcinácia vakcinačnými návnadami Kamark (Mevak a.s., Nitra, SR); resp. Lysvulpen (Bioveta, Ivanovice na Hané, ČR). V roku 1992 bolo do Národného referenčného pracoviska pre besnotu (NRPB) v Košiciach dodaných na izolačné pokusy 21 materiálov (časti CNS); 10 materiálov v roku 1993, 75 materiálov v roku 1994 a 22 materiálov v roku 1995. Časti CNS boli získané od mladých líšok vyšetrených (s pozitívnym výsledkom) LDB ŠVÚ na prítomnosť rabického antigénu PMIF.

Identifikácia lyssavírusových kmeňov pomocou monoklonálnych protilátok

Materiál pre prípravu otláčkových preparátov bol získaný z mozgu cicajúcich myši infikovaných hore uvedeným spôsobom. Vysušené otláčkové preparáty boli fixované v acetóne pri teplote -20 °C po dobu štyroch hodín a po vysušení do vyšetrenia (identifikácie izolovaných kmeňov pomocou monoklonálnych protilátok) udržiavané v hermeticky uzatvorených sklenených nádobách pri teplote -20 °C.

Pre identifikáciu izolovaných rabických kmeňov z roku 1992 a 1993 boli použité dve antinukleokapsidové monoklonálne protilátky MAB-1 (W 239.17) a MAB-2 (W 187.5), získané z Referenčného centra WHO pre besnotu v Tübingene (Nemecko), prostredníctvom Dr. O. Matoucha (SVÚ Liberec). V roku 1994 a 1995 na identifikáciu bol použitý krátky panel troch antinukleokapsidových monoklonálnych protilátok MAB-1, MAB-2 a MAB-4 (W 187.6.1.), získaný z Referenčného centra WHO pre besnotu v Tübingene (Prof. W. Müller). Preparáty boli farbené nepriamou metódou imunofluorescencie (NMIF) (Wiktor a i., 1980). Bol použitý antimyši konjugát SwAM/FITC (ÚSOL Praha, ČR; resp. SIGMA, USA).

Paralelne boli vykonané analogické konfrontačné vyšetrenia s referenčným kmeňom CVS, vakcinačným kmeňom SAD B-19 a Vnukovo-32/107, autochtóнным líščim kmeňom 107/94; v rokoch 1994 a 1995 tiež východonemeckým líščim uličným kmeňom L-Berlin V-317. Ofarbené preparáty boli prehlíadané fluorescenčným mikroskopom Fluoval (Nemecko), resp. Nikon (Japonsko); zväčšenie 100 x 6,3. Bola posudzovaná tiež intenzita fluorescencie a charakter fluoreskujúcich útvarov.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkove do NRPB v Košiciach na cieľené virologické vyšetrenie v rokoch 1992 až 1995 bolo dodaných 134 vzoriek líščích mozgov. Z nich šesť pre značne pokročilý rozklad neboli vhodné pre vyšetrenia. Zo 128 materiálov boli vykonané izolačné pokusy; metódou intracerebrálnej infekcie cicajúcich myši bolo izolovaných 128 rabických kmeňov (resp. izolátov). PMIF (farbením polyklonálnym konjugátom) v otláčkoch z mozgu experimentálne infikovaných myši bol detekovaný rabický antigén.

Podľa dovtedy platných pravidiel – doporučení WHO (1989) pre interpretáciu výsledkov diferenciácie uličných a vakcinačných kmeňov (kmeň SAD a jeho deriváty) pomocou monoklonálnych protilátok, bolo dostačujúce použitie dvoch monoklonálnych protilátok MAB-1 (W 239.17) a MAB-2 (W 187.5).

Všetkých 31 rabických kmeňov izolovaných v rokoch 1992 a 1993 bolo identifikovaných ako uličné, čo svedčí o apatogenite vakcinačného kmeňa Vnukovo-32/107 (použitého k výrobe vakcinačných návnad Kamark (Mevak a.s., Nitra, SR). Výsledky sú uvedené v tab. I.

V ďalšej časti našej práce boli zohľadnené nové poznatky. Cox a i. (1992) publikovali údaje o výskyte „líščích kmeňov“ (variantov uličných kmeňov) vo východnej časti Nemecka, ktoré nereagovali s MAB-2. Preto sa na typizáciu izolovaných rabických kmeňov z územia, kde sa vykonáva orálna antirabická vakcinácia, používa panel minimálne troch monoklonálnych protilátok MAB-1, MAB-2, MAB-4. Tento je dostačujúci: MAB-1 reaguje so všetkými izolovanými lyssavírusmi, MAB-2 reaguje s vírusom európskej líščej besnoty, ale nie so SAD a jeho variantami a európskymi netopierimi vírusmi (EBL), MAB-4 reaguje so všetkými uličnými kmeňmi, ale nie so SAD a jeho variantami a tiež nie s európskymi netopierimi kmeňmi (Cox a i., 1992).

V roku 1994 bolo v NRPB izolovaných 75 kmeňov rabického vírusu, pomocou panelu troch monoklonálnych protilátok a konfrontačným vyšetrením boli tieto identifikované ako uličné kmene. V roku 1995 bolo nami izolovaných 22 kmeňov rabického vírusu. Tieto sme identifikovali pomocou hore uvedeného panelu troch monoklonálnych protilátok. Výsledky sú uvedené v tab. II.

I. Izolácia a identifikácia (pomocou monoklonálnych protilátok) kmeňov vírusu besnoty z CNS lišok odlovených vo vakcinačných zónach na Slovensku v rokoch 1992 a 1993 na 25. až 45. deň po vykonaní orálnej vakcinácie – Isolation and identification (by means of monoclonal antibodies) of rabies virus strains from the CNS of foxes bagged in vaccinations areas in Slovakia in 1992 and 1993 at days 25 to 45 after oral vaccination

Kmeň ¹	Monoklonálna protilátka ²	
	MAB-1	MAB-2
21 kmeňov izolovaných od lišok v roku 1992 ³	+	+
10 kmeňov izolovaných od lišok v roku 1993 ⁴	+	+
CVS	+	+
SAD B-19	+	-
Vnukovo-32/107	+	-

¹strain, ²monoclonal antibody, ³21 strains isolated from foxes in 1992, ⁴10 strains isolated from foxes in 1993

II. Izolácia a identifikácia (pomocou monoklonálnych protilátok) kmeňov vírusu besnoty z CNS lišok odlovených vo vakcinačných zónach na Slovensku v rokoch 1994 a 1995 na 25. až 45. deň po vykonaní orálnej vakcinácie – Isolation and identification (by means of monoclonal antibodies) of rabies virus strains from the CNS of foxes bagged in vaccinations areas in Slovakia in 1994 and 1995 at days 25 to 45 after oral vaccination

Kmeň ¹	Monoklonálna protilátka ²		
	MAB-1	MAB-2	MAB-4
75 kmeňov izolovaných od lišok v roku 1994 ³	+	+	+
22 kmeňov izolovaných od lišok v roku 1995 ⁴	+	+	+
Uličný liščí autochtónny kmeň 107/94 ⁵	+	+	+
Východonemecký uličný liščí kmeň ⁶	+	-	+
L-Berlin V-317 CVS	+	+	+
SAD B-19	+	-	-
Vnukovo-32/107	+	-	-

¹strain, ²monoclonal antibody, ³75 strains isolated from foxes in 1994, ⁴22 strains isolated from foxes in 1995, ⁵street fox autochthonous strain 107/94, ⁶East Germany street fox strain

Izolácia a následná identifikácia kmeňov vírusu besnoty pomocou panelu monoklonálnych protilátok od lišok – očkovancov zo zóny vakcinácie (v rámci komplexného priebežného monitoringu orálnej antirabiekej vakcinácie) je nutná pre rozlíšenie vakcinačných kmeňov vírusu od uličných, resp. pre vylúčenie novej reverzie či mutácie použitého živého vakcinačného vírusu (Schneider a i., 1985a, b; WHO, 1984).

Cieľným vyšetrením vykonaným v rokoch 1992, 1993, 1994 a 1995 sme od lišok obyčajných, odlovených v zóne vakcinácie na Slovensku, izolovali 128 kmeňov vírusu besnoty. Pomocou krátkeho panelu monoklonálnych protilátok (a konfrontáciou s autochtónnym liščím uličným kmeňom 107/94, východonemeckým liščím uličným kmeňom L-Berlin V-317, kmeňom CVS, kmeňom SAD B-19 a kmeňom Vnukovo-32/107) nami izolované kmene boli identifikované ako uličné kmene.

Z výsledkov vyplýva, že na Slovensku použité vakcíny na orálnu antirabieku neobsahovali vakcinačný kmeň patogénny pre extrémne vnímavý druh – lišku obyčajnú, resp. že vakcinačné kmene (Vnukovo-32/107, resp. SAD-Bern) sú dostatočne adekvátne.

LITERATÚRA

- COX, H. J. – SCHNEIDER, L. G. – MÜLLER, W. W. (1992): Eine Antigenvariante der Fuchstollwut in Europa. *Tierärztl. Umsch.*, **47**, 824–828.
- DEAN, D. J. – ABELSETH, M. K. (1973): The fluorescent antibody test. In: KAPLAN, M. M. – KOPROWSKI, H. H. (eds.): *Laboratory techniques in rabies*. 3rd ed. Geneva, WHO, pp. 73–84.
- DEDEK, L. – MATOUCH, O. – VRZAL, V. – KAPPELER, A. (1993): Vakcíny k orálnej imunizácii lišiek proti vzteklině. *Veterinářství*, **43**, 368–370.
- ĐUROVE, A. – ŠVRČEK, Š. – SOKOL, J. – SÜLIOVÁ, J. – ONDREJKA, R. – BENÍŠEK, Z. – ZÁVADOVÁ, J. – JANUŠOVÁ, K. – LOVÁS, B. – BORSUKOVÁ, O. – KUBINEC, J. (1996): Orale Immunisierung freilebender Rotfüchse gegen Tollwut in der Slowakei im Jahre 1994. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, **83**, 158–163.
- KOPROWSKI, H. H. (1973): The mouse inoculation test. In: KAPLAN, M. M. – KOPROWSKI, H. H. (eds.): *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd ed. Geneva, WHO, pp. 85–93.
- SCHNEIDER, L. G. (1985): Oral immunisation of wildlife against rabies. *Ann. Virol. Inst. Pasteur*, **13** GE, 329–332.

- SCHNEIDER, L. G. – MEYER, S. (1981): Antigenic determinants of rabies virus as demonstrate by monoclonal antibody. In: BISHOP, D. H. L. – COMPANS, R. W. (eds.): The Replication of Negative Strand Viruses. Elsevier North Holland, pp. 945–953.
- SCHNEIDER, L. G. – ODEGAARD, Q. A. – MUELLER, J. – SELIMOV, M. A. (1985a): 11. Arctic Viruses. In: KUWERT, E. – MERIEUX, C. – KOPROWSKI, H. – BÖGEL, K. (eds.): Rabies in the Tropics. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Springer-Verlag, pp. 47–59.
- SCHNEIDER, L. G. – COX, J. H. – WANDELER, A. I. – BLANCOU, J. – MEYER, S. (1985b): III. Oral Rabies Vaccine. In: KUWERT, E. – MERIEUX, C. – KOPROWSKI, H. – BÖGEL, K. (eds.): Rabies in the Tropics. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 47–59.
- SMITH, J. S. – BAER, G. (1988): Epizootology of Rabies: The Americas. In: CAMPBELL, J. B. – CHARLTON, K. M. (eds.): Rabies. Boston, Kluwer Academic Publishers, pp. 267–299.
- ŠVRČEK, Š. (1994): Orálna antirabická vakcinácia líšok proti besnote. Metodické pokyny. Bratislava, ŠVS SR, 15 s.
- ŠVRČEK, Š. – SOKOL, J. – ĐUROVE, A. – SŮLIOVÁ, J. – ONDREJKA, R. – ZÁVADOVÁ, J. – BENÍŠEK, Z. – LOVÁS, B. – BORSUKOVÁ, O. – KUBINEC, J. (1994): Epizootological situation and control of rabies in the Slovak Republik. In: Proc. WHO Rabies Conf., Pulawy, 27–28 January, 1994.
- ŠVRČEK, Š. – ONDREJKA, R. – BENÍŠEK, Z. – VRTIAK, O. J. – SELIMOV, M. A. – ZÁVADOVÁ, J. – ĐUROVE, A. – SŮLIOVÁ, J. – MAĐAR, M. (1995a): Quantification of residual virulence of the Vnukovo-32/107. Rabies virus vaccination strain. Vet. Med. – Czech, 40, 53–64.
- ŠVRČEK, Š. – ĐUROVE, A. – ONDREJKA, R. – ZÁVADOVÁ, J. – SŮLIOVÁ, J. – BENÍŠEK, Z. – VRTIAK, O. J. – FEKETEOVÁ, E. – MAĐAR, M. (1995b): Immunogenic and antigenic activity of an experimental oral rabies vaccine prepared from the strain Vnukovo-32/107. Vet. Med. – Czech, 40, 87–96.
- WHO (1984): Expert Committee on Rabies. 7th Report. Technical Report Series No. 709. Geneva, pp. 9–10.
- WIKTOR, T. J. – FLAMAND, A. – KOPROWSKI, H. H. (1980): Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infections and differentiation of rabies and rabies-related viruses. J. Virol. Meth., 1, 33–46.

Received: 96–07–19

Accepted: 96–08–28

Kontaktná adresa:

MVDr. Róbert Ondrejka, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/622 99 24, fax 095/632 36 66

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem. Časopis zveřejňuje i názory, postřehy a připomínky čtenářů ve formě kurzívy, glosy, dopisu redakci, diskusního příspěvku, kritiky zásadního článku apod., ale i zkušenosti z cest do zahraničí, z porad a konferencí.

Autoři jsou plně odpovědní za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetel k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce imprimitované vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením všech autorů, že se zveřejněním souhlasí.

Rozsah původních prací nemá přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI.

Rukopis má být napsán na papíře formátu A4 (30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořízenou na PC s uvedením použitého programu. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

Název práce (titul) nemá přesáhnout 85 úhozů a musí dát přesnou představu o obsahu práce. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

Krátký souhrn (Abstrakt) musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo v práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě.

Rozšířený souhrn prací v češtině nebo slovenštině je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné jej (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

Literární přehled má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému. Tato úvodní část přináší také informaci, proč byla práce provedena.

Metoda se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál a způsob hodnocení výsledků.

Výsledky tvoří hlavní část práce a při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostacích a výsledky se konfrontují s údaji publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu spolu s výsledky.

Literatura citovaná v textu práce se uvádí jménem autora a rokem vydání. Do seznamu se zařadí jen publikace citované v textu. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů.

Klíčová slova mají umožnit vyhledání práce podle sledovaných druhů zvířat, charakteristik jejich zdravotního stavu, podmínek jejich chovu, látek použitých k jejich ovlivnění apod. Jako klíčová slova není vhodné používat termíny uvedené v nadpisu práce.

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PŠČ, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short or a longer summary. The journal also publishes readers' views, remarks and comments in form of a text in italics, gloss, letter to the editor, short contribution, review of a major article, etc., and also experience of stays in foreign countries, meetings and conferences.

The authors are fully responsible for the originality of their papers, for its subject and formal correctness. The authors shall make a written declaration that their papers have not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper. The editors accept papers approved to print by the head of the workplace or papers with all the authors' statement they approve it to print.

The extent of original papers shall not exceed ten typescript pages, including tables, figures and graphs.

Manuscript should be typed on standard paper (quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript). A PC diskette with the paper text or graphical documentation should be provided with the paper manuscript, indicating the used editor program. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

The title of the paper shall not exceed 85 strokes and it should provide a clear-cut idea of the paper subject. Subtitles of the papers are not allowed either.

Abstract. It must present information selection of the contents and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keywords and comprise base numerical data including statistical data.

Introduction has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form. This introductory section also provides information why the study has been undertaken.

Review of literature should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material and the method of result evaluation.

In the section **Results**, which is the core of the paper, figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

Discussion contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections **Results** and **Discussion** may be presented as one section only.

References in the manuscript are given in form of citations of the author's name and year of publication. A list of references should contain publications cited in the manuscript only. References are listed alphabetically by the first author's name.

Key words should make it possible to retrieve the paper on the basis of the animal species investigated, characteristics of their health, husbandry conditions, applied substances, etc. The terms used in the paper title should not be used as keywords.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telephone and fax number, or e-mail.

CONTENTS

Pivko J., Baran V., Grafenau P., Kopečný V., Pelechatyj N. S., Bondarčuk V. N., Kožuch A. J., Kovalčík L. M.: A study of the dynamical ultramicro morphology of differentiating cow early embryo nucleoli in embryos collected in the area of chronic irradiation near Tchernobyl.....	33
Lány P., Pospíšil Z., Zendulková D., Číhal P., Jahn P.: An equine influenza outbreak in the Czech Republic in the fall of 1995: an epidemiological study.....	39
Vajner L., Vortel V., Brejcha A.: Lymphocytic thyroiditis in beagle dogs in a breeding colony: histological findings (in English).....	43
Süliová J., Beníšek Z., Švrček Š., Ďurove A., Ondrejka R.: The effectiveness of inactivated, purified and concentrated experimental rabies vaccine for veterinary use: immunogenic activity (in English). ..	51
Ondrejka R., Ďurove A., Švrček Š., Beníšek Z., Süliová J.: Isolation and identification of lyssa virus strains from the area of oral antirabies vaccination in Slovakia	57

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

OBSAH

Pivko J., Baran V., Grafenau P., Kopečný V., Pelechatyj N. S., Bondarčuk V. N., Kožuch A. J., Kovalčík L. M.: Dynamická ultramikromorfológia nukleolárneho aparátu preimplantačných embryí kráv z oblasti chronického rádioaktívneho ožiarenia	33
Lány P., Pospíšil Z., Zendulková D., Číhal P., Jahn P.: Epizootologická studie vzplanutí chřipky koní v České republice na podzim roku 1995.....	39
Vajner L., Vortel V., Brejcha A.: Lymfocytární thyreoiditis psů plemene beagle v chovné kolonii: histologické nálezy	43
Süliová J., Beníšek Z., Švrček Š., Ďurove A., Ondrejka R.: Účinnost inaktivované, purifikované a koncentrované vakcíny proti vzteklině pro veterinární použití: imunogenní aktivita	51
Ondrejka R., Ďurove A., Švrček Š., Beníšek Z., Süliová J.: Izolácia a identifikácia lyssavírusových kmeňov z oblasti vykonania orálnej antirabickej vakcinácie na Slovensku.....	57