

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500017-7

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD
ACADEMIA SCIENTIARUM BOHEMOSLOVENICA

FOLIA BIOLOGICA

TOMUS II
FASCICULUS 3



Fol. biol. (Praha)

Tom. 2 - Fasc. 3

Praha 30. 7. 1956

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500017-7

F O L I A B I O L O G I C A (P R A H A)

Mezhdunarodnoe izdanie žurnalov Československá biologie и Československá mikrobiologie

Редакционная коллегия:

Академик И. Малек (главный редактор), В. Брнанский, М. Гашек, чл.-корр. ЧСАН Ф. Герчик, академик О. Ировец, Ю. Манура, академик С. Прат, В. Росицкий (секр. ред. коллегии), Л. Черный, Я. Штерцль.

Переводы на русский язык: доц. д-р Широ́ва, на английский язык: д-р Ридессова, на немецкий язык: д-р Файгль

Издается Биологическим институтом Чехословацкой Академии наук в Издательстве ЧСАН. Выходит 6 раз в год. Подписная цена на 1 год Kčs 60.—, цена одного номера Kčs 10.—. Адрес редакции: Биологический институт ЧСАН, На цвичишти 2, Прага XIX. Заказы: Артия, Смечки 30, Прага II, Чехословакия.

F O L I A B I O L O G I C A (P R A H A)

International Edition of the Journals Československá biologie and Československá mikrobiologie

Editorial Board:

Academician I. Málek (Chief Editor), L. Černý, M. Hašek, Corresponding Member of the Czechoslovak Academy of Science F. Herčík, Academician O. Jirovec, J. Macura, Academician S. Prát, V. Rosický (Editorial Secretary), J. Šterzl, V. Vršanský.

Translations into Russian: Dr Schierová, into English: Dr Ridesová, into German: Dr Feigl.

Issued by Biologický ústav Československé akademie věd at Nakladatelství Čs. akademie věd. Yearly subscription (6 numbers) Kčs 60. Single number Kčs 10. Address: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Orders: Artia, Smečky 30, Praha II, Czechoslovakia.

F O L I A B I O L O G I C A (P R A H A)

Internationale Ausgabe der Zeitschriften Československá biologie und Československá mikrobiologie

Redaktionsrat:

Akademienmitglied I. Málek (leitender Redakteur), L. Černý, M. Hašek, korresp. Mitgl. d. Čs. Akademie d. Wiss. F. Herčík, Akademienmitglied O. Jirovec, J. Macura, Akademienmitglied S. Prát, V. Rosický (Redaktions-Sekretär), J. Šterzl, V. Vršanský.

Die Übersetzungen besorgt Doz. Dr A. Schierová für die russischen, Dr A. Ridesová für die englischen und Dr T. Feigl für die deutschen Artikel.

Herausgeber: Biologický ústav Československé akademie věd durch Vermittlung des Nakladatelství Čs. akademie věd. 6 Lieferungen jährlich. Abonnementpreis 60 Kčs, Preis der Einzelnummer 10 Kčs. Anschrift der Redaktion: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Zu beziehen durch: Artia, Smečky 30, Praha II, Československo.

FOLIA BIOLOGICA

Том. II. (1956) — Fasc. 3

Длительная иммунизация

Изменения в образовании антител, в лейкоцитарной и температурной реакции

Я. ШТЕРЦЛЬ

Биологический институт ЧСАН, микробиология, Прага

Поступило в редакцию 26 III 1956

При ежедневно повторяющихся впрыскиваниях антигена вначале наблюдается выразительное повышение образования в организме антител. Если введение антигена длится несколько месяцев, титр антител снижается, и их образование не может быть доказано даже непосредственно в ткани селезенки (Taliaferro 1951, Штерцль 1954). Это явление напоминает иммунологическое торможение Здродовского (1950, 1954), «отсутствие иммунологического ответа» (Dixon и Mauger 1955 б) или «иммунологический паралич» (Felton 1942, 1949).

Центральный вопрос нашей работы: означает ли постепенное падение образования антител действительно иммунологическое торможение, т. е. снижение защитных способностей организма. — или же в течение повторяющихся впрыскиваний антигена наступает адаптация, уменьшение реакции на чужеродные белки при сохранении хорошей противозаразной защитной способности. Поставить вопрос так означает необходимость определить изменения не только в образовании антител, но и в остальных реакциях, связанных с процессами иммунитета, как температурная и лейкоцитарная реакции и цитологические изменения перитонеального экссудата.

В настоящем сообщении мы сравниваем изменения в образовании антител (при длительной иммунизации) с изменениями температурной и лейкоцитарной реакций.

Материал и методы

Мы иммунизировали три группы крыс (30, 30 и 10 животных) с помощью ежедневных интраперитонеальных впрыскиваний 1 мл взвеси бактерий *Salmonella paratyphi B*, инактивированных при 70 °С в течение 1 часа ($5 \cdot 10^7$ микробов в 1 мл). Одну группу крыс (15) мы иммунизировали ежедневно 1 мл ($2 \cdot 10^9$ микробов) под кожу на спинке.

Двум группам кроликов (3 и 5) ежедневно вводился внутривенно 1 мл взвеси ($5 \cdot 10^7$ микробов). По истечении 5 месяцев вторая группа продолжала ежедневно иммунизироваться дозой в $2 \cdot 10^9$ микробов. Третью и четвертую группы (12 и 10 кроликов) мы сразу иммунизировали дозой в $2 \cdot 10^9$ в 1 мл.

Титр агглютинирующих антител определялся нами через 2, 4 и 6 дней хранения в холодильнике при 2 °С. Титр неполных антител определялся с помощью теста блокировки и антиглобулиновой реакции. Тест блокировки производился путем смешения 0,5 мл различных разведений исследуемой сыворотки с 0,5 мл агглютинационной сыворотки против *S. paratyphi B*, прибавлявшейся в крайних разведениях (напр., титр агглютинационной сыворотки 1 : 500, — в опыте же, при конечном разведении 1 : 300). Мы прибавляли 1 мл агглютинирующей взвеси и помещали смесь в холодильник. Вычисления производились, как при нормальной агглютинации.

Антиглобулиновый тест по Coombs-у мы использовали у разведений, оказавшихся негативными при нормальной реакции агглютинации. В большинстве случаев он делался так, что 0,5 мл сыворотки смешивалось с 0,5 мл антигена и после 2-часового отстаивания при 37 °С центрифугировалось в течение 20 мин. при 4.000 об/мин. Сыворотка отделялась, а антиген

трижды промывался физиологическим раствором. При последнем разведении антигена в 0,2 мл физиологического раствора к нему прибавлялись 0,2 мл разведенной антиглобулиновой сыворотки. Сыворотка против кроличьего глобулина приготавливалась путем интраперитонеальной иммунизации кроликов. Титр антиглобулиновой сыворотки определялся с помощью реакций гемагглютинации и преципитации. Конечное разведение антиглобулиновой сыворотки (в котором она прибавлялась к промытой агглютинирующей взвеси) приводится в отдельных таблицах. К каждому опыту мы ставили контрольный — для проверки надежности реакции: не происходит ли в течение промывания и центрифугирования самопроизвольная агглютинация).

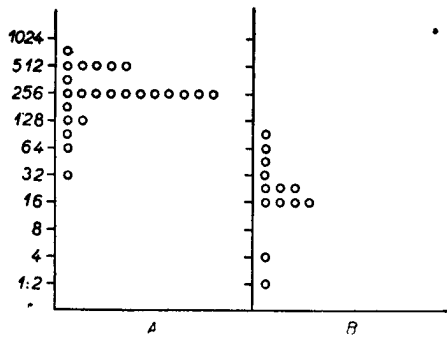


Рис. 1. Титры антител у группы крыс, иммунизированной интраперитонеально ежедневными дозами антигена ($5 \cdot 10^7$ микробов в 1 мл). Начало иммунизации 7/XII. А — титр агглютинации через 10 дней (17/XII). В — титр антител через месяц после начала иммунизации.

числах, так как ввиду частых колебаний исходных величин был неприменим индекс температуры Веесона (1947). Манипуляции с животными производились каждый день при неизменных условиях, чтобы они могли послужить в качестве составной части условного импульса при опытах определения условнорефлекторной реакции.

Результаты

Изменения титра антител. Исследуя у 3 групп крыс титры агглютинации после внутривентральных инъекций антигена, мы убедились, что этот способ иммунизации вызывает у животных падение титра антител. Однако и после длительных инъекций уровень антител держится на титре 1 : 8—1 : 32. Попытки определения неполных антител в негативных разведениях сыворотки дали отрицательные результаты (рис. 1).

Напротив, у крыс, иммунизированных ежедневно подкожно, даже после введения больших доз титр антител не менялся сколько-нибудь значительно

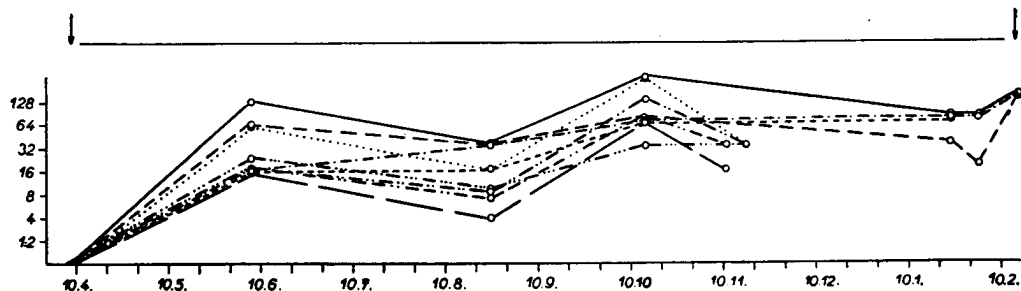


Рис. 2. Титры антител у группы крыс, иммунизированной ежедневно подкожными инъекциями 1 мл антигена ($2 \cdot 10^9$ микробов). Уменьшение количества животных в ходе иммунизации является результатом того, что динамика инфекции исследовалась в различных фазах иммунизации.

в течение почти целого года (рис. 2). У этих животных нам также не удавалось доказать повышения титра неполных антител в сравнении полными антителами.

Более выразительное торможение образования антител наблюдается при внутривенных впрыскиваниях антигена кроликам. Ежедневная иммунизация дозой в $5 \cdot 10^7$ микробов в течение 2 месяцев вызывает у кроликов снижение титра антител. Однако при увеличении антигенного импульса в 40 раз торможение уже далее не увеличивается, а напротив, снова наблюдается образование антител (рис. 3).

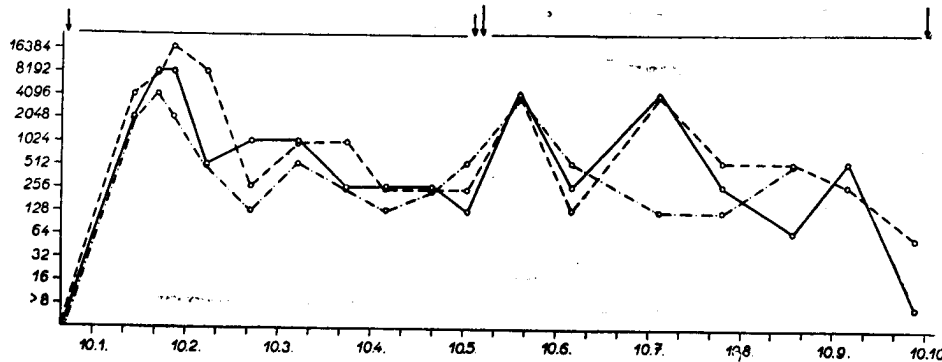


Рис. 3. Титры антител у кроликов № 706, 707 и 708, иммунизированных ежедневно, начиная с 3/1, с помощью внутривенных инъекций 1 мл антигена ($5 \cdot 10^7$ микробов). Начиная с 16/V ежедневные дозы были увеличены в 40 раз ($2 \cdot 10^9$ микробов в 1 мл).

У нескольких следующих групп мы сразу приступили к внутривенным впрыскиваниям $2 \cdot 10^9$ микробов. И здесь после фазы повышенного образования антител в течение первого месяца наблюдается резкое снижение титра агглютинирующих антител. Одновременно произведенные антиглобулиновый тест и тест блокировки не показывали повышения уровня неполных антител (табл. 1, 2). Кроликам одной группы мы в период максимального падения титра антител ввели интракардиально $4 \cdot 10^9$ живых микробов. Эта доза послужила импульсом

Табл. 1. Антиглобулиновый тест у кроликов, иммунизированных, начиная со 2/XII, внутривенно ежедневными дозами антигена ($2 \cdot 10^9$ микробов в 1 мл). Тест блокировки у тех же кроликов 28/1, 23/II и 7/IV. Прибавлялась кроличья сыворотка против *S. paratyphi B* (титр 1 : 256) так, чтобы при тесте окончательное разведение было 1 : 100. Ни при одном из испытаний не было отмечено подавление агглютинации.

Кролик №	Взятие крови	Агглютинационный титр	Способ осуществления теста	Антиглобулиновая сыворотка — разведение	Результаты
58	23/II	1 : 256	После смешивания сыворотки с антигеном инкубация в течение 2 час. при 37°С, промывание и центрифугирование	К 0,2 мл промытого антигена прибавлялось 0,2 мл сыворотки хомьяка, разведенной на 1 : 10 (титр геммагглютинации эритроцитов кролика 1 : 1280, преципитации 1 : 1000)	1 : 256
79	23/II	1 : 256			1 : 4.096
54	23/II	1 : 512			1 : 256
64	23/II	1 : 2.048			1 : 2.048
280	23/II	1 : 128			1 : 128
58	7/IV	1 : 128			1 : 512
79	7/IV	2 : 256			×
54	7/IV	1 : 128			1 : 512
64	7/IV	1 : 512			1 : 32
280	7/IV	1 : 1.024			1 : 256
811	7/IV	1 : 64			1 : 128

для нового образования антител. Повышение не было вызвано неспецифическим выделением антител: их титр повысился не через 24 часа, а только в течение 10—14 дней (рис. 5).

Изменения лейкоцитарной реакции и изменения в перитонеальном экссудате. У группы 20 крыс мы исследовали лейкоцитарную реакцию до и через 1/2 и 3 часа после внутрибрюшного впрыскивания 1 мл антигена. Изменения в картине крови отмечались в течение 1 недели после начала иммунизации, через 1 и через 5 месяцев. Итоги опытов: в результате ежедневной иммунизации, торможения реакции на вводимый антиген не создается. Лейкоцитарная реакция не приобретает устойчивого характера: фазы падения количества лейкоцитов чередуются с фазами повышения их количества. С помощью впрыскиваний непиrogenного физиологического раствора (вместо ежедневных антигенных импульсов) мы не доказали того, что длительно сохраняющаяся лейкоцитарная реакция могла бы носить условнорефлекторный характер.

У той же группы крыс мы после внутрибрюшных иммунизирующих впрыскиваний исследовали цитологические изменения в перитонеальном экссудате. После ежедневных уколов антигена в peritoneum возникает полиморфонуклеарный экссудат. Уколы физиологического раствора нормальным животным вызывают образование макрофагов (рис. 6). Если же физиологический раствор

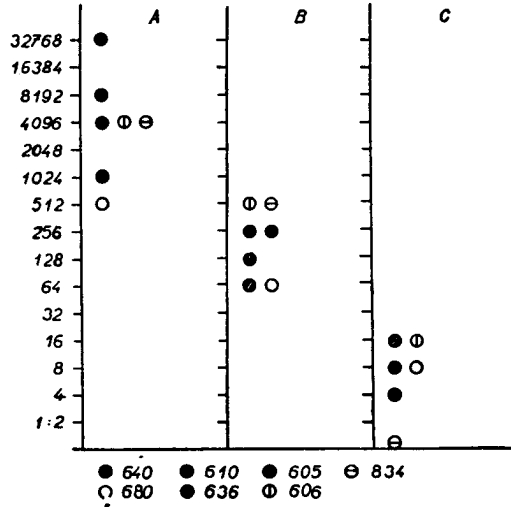


Рис. 4. Группа кроликов № 640, 680, 635, 605, 606 и 834, иммунизированных ежедневно, начиная с 27/V, с помощью 1 мл антигена ($2 \cdot 10^7$ микробов). А — показатели агглютинации 27/VI. В — титр антител 11/VII. С — титр антител 17/VIII.

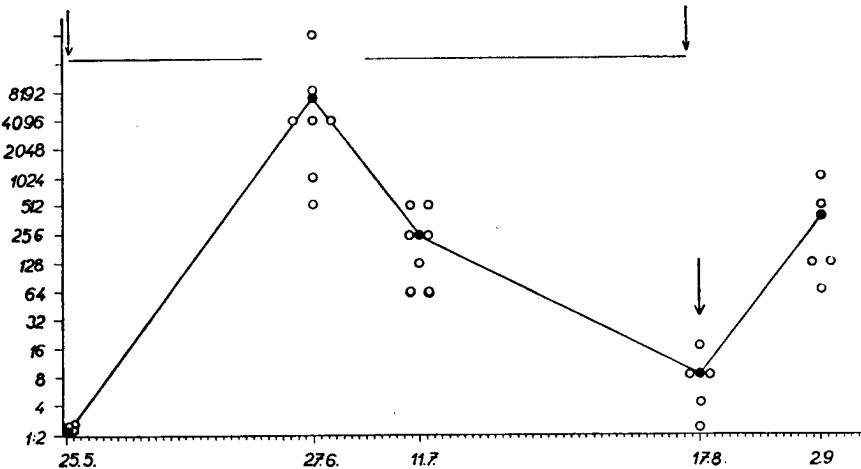


Рис. 5. Развитие во времени торможения образования антител у группы кроликов, иммунизированных ежедневно, начиная с 27/V по 17/VIII дозой антигена ($2 \cdot 10^9$ микробов в 1 мл). 18/VIII было впрыснуто внутриартериально 2 мл взвеси живых микробов ($4 \cdot 10^9$ микробов). Титры антител определялись через 14 дней.

Табл. 2. Антиглобулиновый тест у кроликов, иммунизированных внутривенно, начиная с 27/V, ежедневными впрыскиваниями 1 мл антигена ($2 \cdot 10^9$ микробов).

Кролик №	Взятие крови	Титр агглютинации	Способ осуществления теста	Антиглобулиновая сыворотка — разведение	Результаты
€03	27/VI	1 : 4.096	2-часовая инкубация при 37 °С, промывание в течение 24 час. в термостате	Пояснения как в табл. 1. Использовалось разведение 1 : 10	1 : 1.024
834	27/VI	1 : 4.096			1 : 1.024
635	27/VI	1 : 8.192			1 : 1.024
610	27/VI	1 : 1.024			1 : 512

Результаты антиглобулинового теста 7/VIII не приводятся, так как все разведения (и контроль) вызывали агглютинацию. Тест блокировки, произведенный 27/VI и 7/VIII, ни в одном разведении не давал подавления агглютинации.

впрыскивается крысам, которые предварительно интраперитонеально иммунизировались, то у них через такой же промежуток времени, как после впрыскивания антигена, образуется полиморфонуклеарный экссудат. Так как сроки и характер цитологических изменений были одинаковые, мы рассматриваем их как условнорефлекторную реакцию, вырабатывающуюся под действием ежедневных внутрибрюшных впрыскиваний антигена (рис. 7, 8).

Изменения картины крови исследовались нами у нескольких групп кроликов. На рис. 9 и 10 указаны сдвиги количества лейкоцитов у одной группы кроликов,

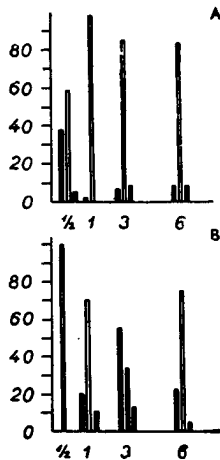


Рис. 6.

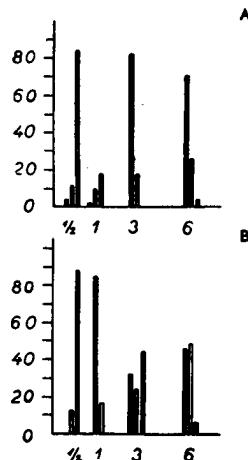


Рис. 7.

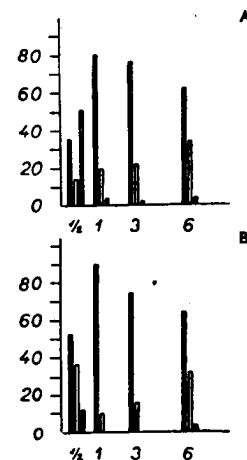


Рис. 8.

Рис. 6. А, В: Нормальным крысам вводился интраперитонеально 1 мл физиологического раствора. Исследовалась цитологическая картина перитонеального экссудата. Белый столбец — макрофаги, черный столбец — полиморфонуклеары, заштрихованный столбец — лимфоциты. Ось X: время в часах, ось Y: процент отдельных клеток в экссудате.

Рис. 7. А: Изменения в перитонеальном экссудате после внутрибрюшного введения 1 мл антигена крысе V, иммунизированной ежедневно в течение 5 месяцев. В: Изменения в перитонеальном экссудате того же животного после внутрибрюшного введения 1 мл физиологического раствора. Пояснения как у рис. 6.

Рис. 8. А: Изменения в перитонеальном экссудате после внутрибрюшного впрыскивания 1 мл антигена крысе M, иммунизированной ежедневно в течение 5 мес. В: Тому же животному был введен интраперитонеально 1 мл физиологического раствора.

иммунизовавшейся внутривенно ежедневными дозами в $2 \cdot 10^9$ микробов. И так, даже ежедневное введение антигена не подавило лейкоцитарной реакции. У кроликов, как и у крыс, устойчивая, стандартная реакция на ежедневные иммунизирующие импульсы не выработалась. В известные периоды фаза увеличения количества лейкоцитов заменяется фазой лейкопении и наоборот. Повидимому, это главная причина, почему при наших опытах после впрыскивания физиологического раствора (вместо антигена) условнорефлекторная реакция не наблюдалась.

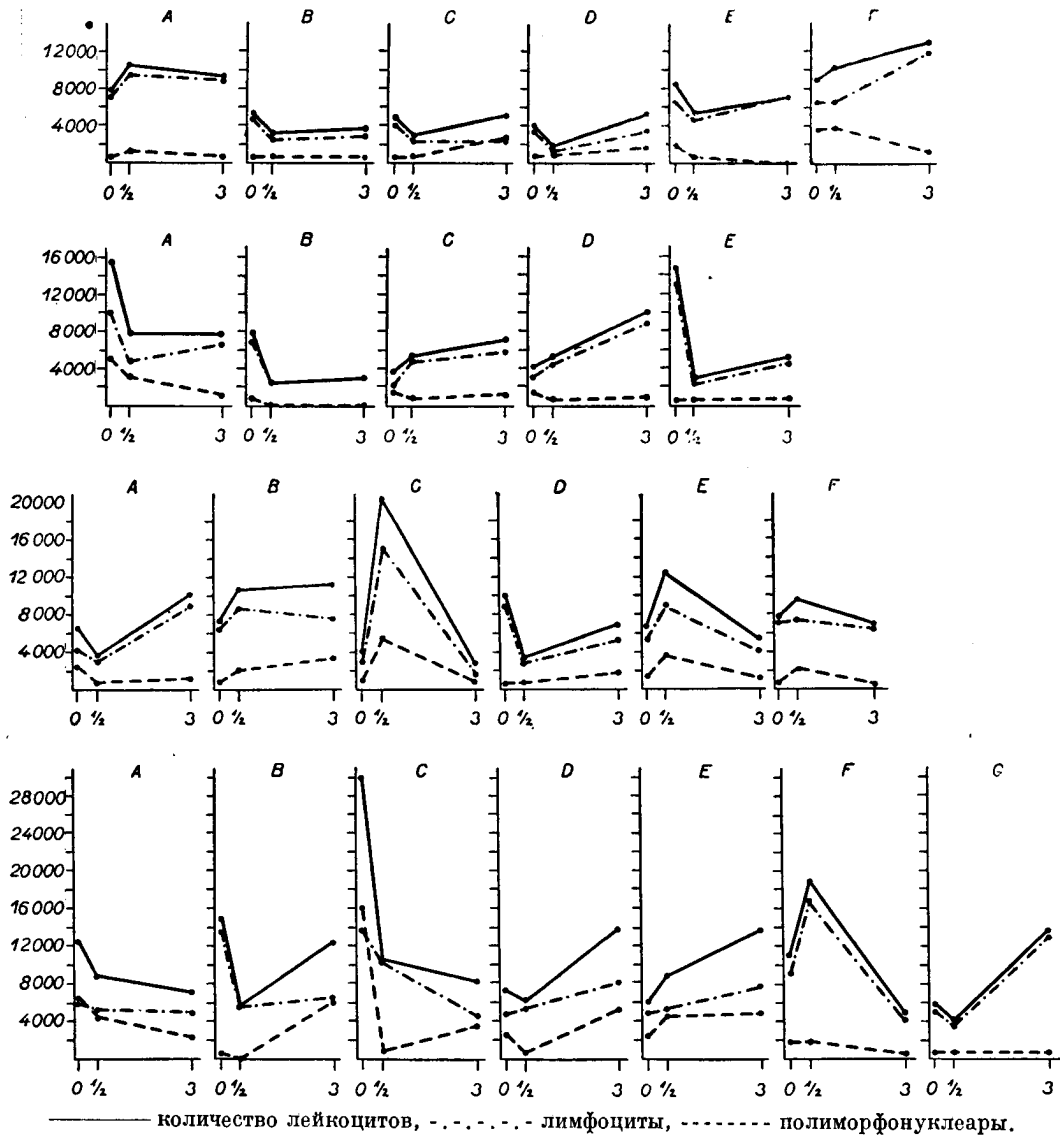
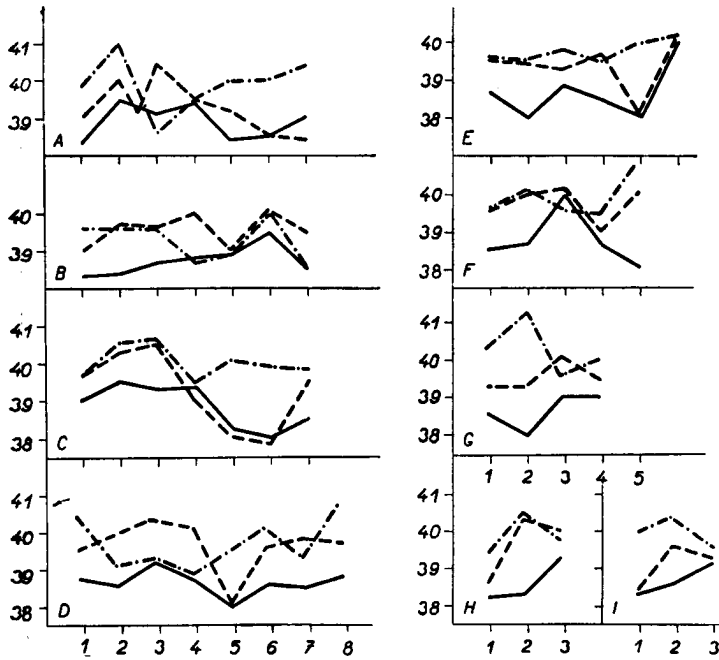


Рис. 9, 10. Изменения картины крови после внутривенных впрыскиваний антигена. Ось X: взятие крови перед и через $\frac{1}{2}$ и 3 часа после иммунизации. Изменения картины крови при ежедневной иммунизации отмечались в следующие дни: А 3/XII, В 9/XII, С 16/XII, D 30/XII, Е 13/I, F 18/II и G 13/IV.

Изменения температурной реакции. Первые наблюдения над группой кроликов показали, что температурная реакция на уколы антигена не исчезала даже после пятимесячной ежедневной иммунизации. Мы контролировали эти наблюдения у большой группы животных. Как показывает рис. 11, несмотря на то, что в ходе длительной иммунизации наблюдаются и временное подавление, и новое усиление температурной реакции, — общая тенденция не меняется даже через 6 месяцев. Кривые температуры до укола и через 1/2 и 3 часа после него не доказывают наличия ни тенденции к подавлению, ни тенденции к усилению температурной реакции. И у этих животных мы пытались установить, не является ли постоянно сохраняющаяся реакция на введение антигена результатом выработавшейся временной условнорефлекторной связи. Мы проверяли это с помощью уколов физиологического раствора, которые делались при таких же условиях, при каких до того вводился антиген. Как показывает табл. 3, несмотря на то, что участие условнорефлекторной реакции у отдельных



животных полностью исключить нельзя, — овышение температуры после впрыскиваний антигена вызывается прежде всего его пирогенным характером.

Рис. 11. Изменения температуры в течение ежедневной иммунизации. Сплошная линия — величины до иммунизации, пунктир — величины через полчаса после иммунизации, точки и черточки — через 3 часа после иммунизации. Измерения температуры производились в следующие дни: 1) 3/XII, 2) 9/XII, 3) 16/XII, 4) 30/XII, 5) 13/I, 6) 27/I, 7) 18/II, 8) 13/IV. Записывалась температура у кроликов: № А 811, В 64, С 280, D 79, Е 52, F 58, G 82, H 8 и I 4.

Дискуссия и резюме

Результаты наших опытов показывают, что у тех же животных, у которых после длительной ежедневной иммунизации добились подавления образования антител, не наблюдалось явление торможения других защитных реакций организма, каковы: лейкоцитарная реакция, цитологические изменения в перитонеальном экссудате и изменения температуры.

Торможение образования антител бывало у кроликов сильнее, чем у крыс, бывало интенсивнее при внутривенной и внутрибрюшной иммунизации, чем при подкожных впрыскиваниях. Интенсивность антигенного импульса (зависящая от чувствительности животного, от количества антигена и от места укола), таким образом, прямо обуславливает скорость наступления и глубину торможения образования антител. Мы не наблюдали повышения титра неполных антител при снижении титра агглютинирующих антител. Таким образом, дело

Табл. 3. Попытка определения условнорефлекторной реакции у кроликов, иммунизированных ежедневно. Изменения температуры после внутривенного введения 1 мл антигена ($2 \cdot 10^9$ микробов) через 5 месяцев после начала иммунизации кроликов № 706, 707, 708 ($5 \cdot 10^7$ микробов).

Кролик №	До иммунизации	Через полчаса после иммунизации	Через 3 часа после иммунизации
58	38,0	40,1	40,8
280	38,5	39,5	39,8
811	39,0	38,4	40,4
54	38,7	39,5	40,6
79	38,8	39,7	40,8
706	38,5	40,2	39,0
707	38,0	39,8	38,0
708	37,8	39,4	38,7

Внутривенное введение 1 мл физиологического раствора тем же иммунизированным кроликам ежедневно

Кролик №	До иммунизации	Через полчаса после укола	Через 3 часа после укола	Реакция
58	38,5	38,8	39,9	+
280	38,8	38,8	39,9	0
811	38,2	38,0	39,8	+
54	38,5	38,4	38,9	±
79	38,8	38,6	38,9	0
706	39,3	40,2	39,3	+
707	38,7	39,7	39,2	+
708	39,3	39,7	39,4	±

Внутривенное введение физиологического раствора нормальным, неиммунизированным кроликам

Кролик №	До иммунизации	Через полчаса после укола	Через 3 часа после укола	Реакция
91	38,6	38,5	38,5	0
827	38,3	38,5	38,5	0
4	38,3	38,8	38,7	±
0	39,2	39,8	39,7	±
1	39,3	39,2	39,3	0
2	39,7	39,7	39,5	0

идет не о «гипериммунизации», а о действительном подавлении образования антител. Однако вполне вероятно, что в результате длительной иммунизации меняется не только соотношение отдельных белковых фракций сыворотки, но и распределение в них антител (Kabat 1953, Porter и Humphrey 1955).

Сравнивая полученные нами результаты с известными из литературы тормозными состояниями образования антител, мы приходим к выводу, что результаты наших работ нельзя отождествлять с иммунологическим параличом Felton-a, — прежде всего потому, что это явление всеми исследователями (Stark 1955, Dixon, Maurer и Weigle 1955) единогласно толкуется как сохранение в организме

пневмококкового полисахарида, который связывает образующиеся антитела. Напротив, когда мы при наших опытах повышали дозу вводимого ежедневно антигена, количество антител в сыворотке не уменьшалось и торможение их образования не усиливалось. Повышение дозы становилось, напротив, импульсом для возобновления образования антител. Мы полагаем поэтому, что при многократном введении антигена создается «адаптация», результатом которой является снижение реакции на импульсы определенной интенсивности. Если импульс усиливается (с увеличением количества вводимого антигена), образование антител возобновляется, причем это — действительное образование, а не анамнестическое выделение антител: их титр в сыворотке повышается не через 24 часа, а только через 10—14 дней после введения большой дозы антигена.

Вполне вероятно, что, поскольку эта «адаптация» распространяется и на другие физиологические механизмы, наступает уменьшение общей чувствительности к антигену как к чужеродному импульсу. Это проявляется потом не только в образовании антител, но и в других физиологических ответах на антигенный импульс. Однако мы не наблюдали ни угнетения лейкоцитарной реакции, ни изменений температуры в связи с длительным введением антигена.

Это обстоятельство необходимо учесть прежде всего потому, что часто встречаются описания снижения температурной реакции в результате многократного введения антигена, содержащего пирогенные вещества (Wright 1930, Beeson 1947, Venett 1948, Рашкова 1954 и др.). При наших опытах температурная реакция сохранялась, повидимому, потому, что мы вводим большие количества антигена. Было установлено (Atkins 1955), что вводимый в организм антиген образует с сывороткой комплекс «экзогенный пироген», который не вызывает температурной реакции у животных с многократными прививками, — т. н. «толерантных». Однако избыток антигена связывается тканями и освобождает из них вещество «эндогенный пироген», вызывающее температурную реакцию всегда, — и у нормальных, и у «толерантных» животных. Повидимому, образование этого пирогенного фактора и является основой устойчивой температурной реакции и в случаях наших подопытных животных. Только этот пирогенный фактор является эффективным раздражителем нервных центров и так вызывает изменения температуры (Grant 1955).

Мы видим в сильном импульсе и первопричину фазовых изменений количества лейкоцитов (чередования его повышения и понижения при одинаковых по силе и качеству антигенных импульсах). Фазовые изменения в ответ на сильный антигенный импульс мы рассматриваем как один из способов нормализации функционального состояния организма. Подобные фазовые изменения картины лейкоцитов после введения больших доз антилейкоцитарной сыворотки были уже нами описаны (Штерцль 1954).

Результаты наших опытов доказывают неправильность предположения относительно существования прямой связи между падением количества лейкоцитов и температурной реакцией. Из рис. 9, 10 видно, что температурная реакция не связана непосредственно с уменьшением их количества: и тогда, когда количество лейкоцитов увеличивается, животные реагируют повышением температуры.

Из своих наблюдений того, что торможение образования антител не сопровождалось снижением интенсивности температурной и лейкоцитарной реакций, мы выводим заключение, что картина образования антител не дает еще представления об общем функциональном состоянии организма. Снижение способности к образованию антител не означает еще всеобщего торможения всех защитных реакций организма. Невозможно поэтому на основании одного показателя (образования антител) рассматривать состояние организма как «иммунологи-

ческое торможение» (Здродовский 1954). Мы убеждаемся, что конкретные проявления различных защитных механизмов не всегда в полной мере зависят от общей реактивности организма. При наших опытах снижение образования антител в результате длительной иммунизации вызывается не общим снижением чувствительности к антигену, как к чужеродному импульсу, а изменениями специфических механизмов, участвующих в образовании антител.

Результаты наших опытов показывают далее, как важно проследить общий ответ организма (лейкоцитарную и температурную реакции) и в других случаях «иммунологического торможения». Это особенно важно в тех случаях, когда подавление образования антител достигается путем введения большой дозы антигена, на которую организм не реагирует образованием антител, — или естественно (в ранних стадиях онтогенеза — Гашек 1953, 1955, Billingham, Brent, Medawar 1953, Buxton 1954, Hanan и Oyama 1954, Hanan и Germuth 1955, Kerr и Robertson 1954, Simonsen 1955, Dixon и Maurer 1955, Cinader 1955), — или же после искусственного вмешательства (напр., после облучения лучами X — Dixon и Maurer 1955). Именно путем изучения не только уровня антител, но и всего широкого регистра физиологических изменений в ответ на введение антигена можно решить вопрос, вызывается ли торможение образования антител и в этих случаях изолированными изменениями механизмов образования антител, — или же это — общее ослабление реакции несовместимости по отношению к специфическим антигенам.

Л и т е р а т у р а

- Г а ш е к, М.: Вегетативная гибридизация животных путем соединения кровообращения в течение эмбрионального развития. *Чсл. Биология* 2 : 267, 1953.
- З д р о д о в с к и й, П. Ф.: Проблема реактивности в учении об инфекции и иммунитете. Москва 1950.
- З д р о д о в с к и й, П. Ф.: Материалы к физиологии процессов инфекций и иммунитета. *Вест. АМН СССР* 3 : 3, 1953.
- З д р о д о в с к и й, П. Ф.: Вопросы инфекционной патологии и иммунологии. Москва 1954.
- A t k i n s, E., B a r r y, W o o d W.: Studies on the Pathogenesis of Fever. I. The Presence of Transferable Pyrogen in the Blood Stream Following the Injection of Typhoid Vaccine. *J. Exp. Med.* 101 : 619, 1955. II. Identification of an Endogenous Pyrogen in the Blood Stream Following the Injection of Typhoid Vaccine. *J. Exp. Med.* 102 : 499, 1955.
- B e e s o n, P. B.: Tolerance to Bacterial Pyrogens. I. Factors Influencing its Development. *J. Exp. Med.* 86 : 29, 1947. II. Role of the Reticuloendothelial System. *J. Exp. Med.* 86 : 39, 1947.
- B e n n e t, I. L.: Observations on the Fever Caused by Bacterial Pyrogens. I. A Study of the Relationship between the Fever Caused by Bacterial Pyrogens and the Fever Accompanying Acute Infection. *J. Exp. Med.* 88 : 267, 1948.
- B e n n e t, I. L., B e e s o n, P. B.: The Properties and Biologic Effects of Bacterial Pyrogens. *Medicine* 29 : 365, 1950.
- B i l l i n g h a m, R. E., B r e n t, L., M e d a w a r, P. B.: Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. *Nature* 172 : 603, 1953.
- B u x t o n, A.: Antibody Production in Avian Embryos and Young Chicks. *J. Gen. Microbiol.* 10 : 398, 1954.
- C a r l i f a n t i, E.: Antitoxin Response to Repeated (Daily) Doses of Diphtheria Toxoid. *J. Immunol.* 66 : 311, 1951.
- C i n a d e r, B., D u b e r t, J. M.: Acquired Immune Tolerance to Human Albumin. III. *Congres Intern. Biochim., Brusel 1955.* (Resumés p. 130.)
- D i x o n, F. J., M a u r e r, P. H., W e i g l e, W. C.: Immunologic Activity of Pneumococcal Polysaccharide Fixed in the Tissues of the Mouse. *J. Immunol.* 74 : 188, 1955.
- D i x o n, E. J., M a u r e r, P. H.: Effects of Large Infusions of Heterologous Serum Proteins on the Serum Protein Metabolism of Rabbits. *J. Exp. Med.* 101 : 233, 1955 (a).
- D i x o n, F. J., M a u r e r, P. H.: Immunologic Unresponsiveness Induced by Protein Antigens. *J. Exp. Med.* 101 : 245, 1955 (b).

- Felton, L. D., Ottinger, B.: Pneumococcus Polysaccharide as a Paralyzing Agent on the Mechanism of Immunity in White Mice. *J. Bact.* 43 : 94, 1942.
- Felton, L. D.: The Significance of Antigen in Animal Tissues. *J. Immunol.* 61 : 107, 1949.
- Felton, L. D., Kauffmann, G., Prescott, B., Ottinger, B.: Studies on the Mechanism of the Immunological Paralysis Induced in Mice by Pneumococcal Polysaccharides. *J. Immunol.* 74 : 17, 1955 (a).
- Felton, L. D., Prescott, B., Kauffmann, G., Ottinger, B.: Pneumococcal Antigenic Polysaccharide Substances from Animal Tissues. *J. Immunol.* 74 : 205, 1955 (b).
- Grant, R., Lewis, J., Ahrens, I.: Effect of Intrahypothalamic Injections of Pyrogens. *Fed. Proc.* 14 : 61, 1955.
- Hanan, R., Oyama, J.; Inhibition of Antibody Formation in Mature Rabbits by Contact with the Antigen at an Early Age. *J. Immunol.* 73 : 49, 1954.
- Hašek, M.: Vegetativní hybridizace živočichů spojením krevních oběhů v embryonálním vývoji. *Čs. biologie* 2 : 265, 1953.
- Hašek, M., Hřaba, T.: Immunological Effects of Experimental Embryonal Parabiosis. *Nature* 175 : 764, 1955.
- Johnson, A. G., Watson, D. W., Cromartie, W. J.: Effect of Masive Antigen Dosage on Antigen Retention and Antibody Response in Rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 88 : 421, 1955.
- Kabat, E. A.: The Unity and Diversity of Antibodies. The Nature and Significance of the Antibody Response. New York 1953 (p. 102).
- Kerr, W. R., Robertson, M.; Passively and Actively Acquired Antibodies for Trichomonas Foetus in Very Young Calves. *J. Hygiene* 52 : 253, 1954.
- Morgan, P., Watson, D. W., Cromartie, W. J.: Type Specificity of Immunological Paralysis Induced in Mice with Pneumococcal Type II. Polysaccharide. *J. Bact.* 65 : 224, 1953.
- Porter, R. R., Humphrey, J. H.: The Change of Antibody Character During Immunisation as Judged by Partition Chromatography. III. Congress Intern. Biochim., Brusel 1955. (Resumés p. 126.)
- Rašková, H., Šteklová, B.: Příspěvek ke vzniku podmíněných horečnatých reakcí. *Čas. lék. českých* 93 : 569, 1954.
- Simonsen, M.: Induced Tolerance to Heterologous Cells and Induced Susceptibility to Virus. *Nature* 175 : 763, 1955.
- Stark, O. K.: A Study of Immunological Paralysis Induced by Type I. Pneumococcal Polysaccharide. *Bact. Proc.* 64, 1954.
- Stark, O. K.: Studies on Pneumococcal Polysaccharide. I. Biosynthesis of C¹⁴ Labeled Type 1 Pneumococcal Polysaccharide. *J. Immunol.* 74 : 126, 1955. II. Mechanism Involved in Production of „Immunological Paralysis“ by Type I. Pneumococcal Polysaccharide. *J. Immunol.* 74 : 130, 1955.
- Šterzl, J.: Obranné pochody v organismu. Mesenchymální tkáň při infekci a imunitaci. Praha 1954.
- Taliaferro, W. H., Taliaferro, L. G.: The Role of the Spleen in Hemolysin Production in Rabbits Receiving Multiple Antigen Injections. *J. Infect. Dis.* 89 : 143, 1951.
- Thomas, L.: The Physiological Disturbances Produced by Endotoxin. *Ann. Rev. Physiol.* 16 : 467, 1954.
- Wright, H. D.: The Effects of Immunisation Upon Temperature Response in Rabbits. *J. Path. Bact.* 33 : 925, 1930.

Long-term Immunisation

Changes in Antibody Formation and Leucocytic and Pyrexial Reactions

J. ŠTERZL

Summary

The daily administration of immunisation doses in laboratory animals (rabbits and rats) leads, after a phase of increased formation of antibodies, to gradual depression of their formation. A simultaneous increase in the titre of incomplete antibodies was not found. The rate of depression of antibody formation is dependent on the species of experimental animal and on the site of injection of the antigen.

If the amount of antigen administered is increased in the course of immunisation, this does not intensify depression of antibody formation; on the contrary, an increase in the dose of the antigen stimulates their further formation.

In animals with depression of antibody formation after six months' daily immunisation, the intensity of the leucocyte changes in the peripheral blood and peritoneal exudate were ascertained after the administration of the immunisation dose, together with the pyrexial reaction. These responses of the organism to the administration of the antigen are fully maintained even in the period of depression of antibody formation. The maintaining of these reactions was not found to be due to the formation of conditioned reflexes rather than to direct stimulation by the antigen.

The conclusion is reached that the decrease in the formation of antibodies following long-term daily immunisation cannot be regarded as a decrease in the general reactivity of the organism, i. e. as "immunological depression", but that it is based on changes in the specific process of antibody formation.

FOLIA BIOLOGICA

Том. II. (1956) — Fasc. 3

Состояние невосприимчивости в течение экспериментальной стафилококковой инфекции

Ю. ЙОГАНОВСКИЙ

Биологический институт ЧСАН, микробиология, Прага

Поступило в редакцию 30 I 1956

Ряд данных свидетельствует о том, что защитная способность организма не объясняется без остатка классическими механизмами антитоксической защиты и фагоцитоза. Интересный вопрос представляют изменения устойчивости в течение инфекции, проявляющиеся через короткое время после различных вмешательств, как впрыскивание белков и вакцин или заражение микробами. Большинство авторов предполагает, что дело здесь идет о неспецифическом повышении активности соединительной ткани (Philipson 1937, Bordet 1939 и др.). Особое место при этом занимает явление т. н. депрессионного иммунитета (Morgenroth 1920, 1921, Крылов 1947 и др.), т. е. состояния устойчивости, которое наступает после введения небольшой дозы того же инфекционного начала. В своей работе мы попытались исследовать механизмы этой реакции на модели внутривенной стафилококковой инфекции у кроликов.

Материал и методы

Большинство опытов производилось по следующей схеме: инфекция небольшой дозой (приблизительно 0,1—0,05 смертельной дозы) культуры стафилококков и реинфекция через 20—24 часа. При реинфекции квантитативно учитывалось количество микробов в крови и в органах, а кроме того количество лейкоцитов в крови. У части опытов мы через 20 часов после первой инфекции производили серологический анализ или определяли состояние организма с помощью внутрикожных и внутривенных впрыскиваний стафилококкового токсина.

Большую часть опытов мы производили с 2 вариантами штамма Wood: одним вирулентным (Wood A) и вторым неvirulentным (Wood B), возникшим в результате длительных пассажей на искусственных питательных средах. Кроме того мы пользовались четырьмя штаммами свежееизолированных из патологического материала стафилококков, несколькими штаммами стрептококков, пневмококков, паратифа В и кишечной палочки. Опыты производились с кроликами весом в 2—3 кг, одной и той же породы, и с морскими свинками весом в 300—400 г.

Приготовление и стандартизация культур для инфекции, квантитативное определение количества микробов и лейкоцитов и т. п. производились так же, как и при наших предыдущих опытах (Йогановский 1956). Изменения антитоксической устойчивости определялись тремя способами: 1) путем титрации действия сыворотки с помощью обычного гемолитического метода (Выгодчиков 1950); 2) по способности организма связывать токсины, впрыскиваемые внутривенно. Она устанавливалась путем определения (с помощью гемолитической титрации) содержания в сыворотке свободного токсина через 10 мин. после внутривенного впрыскивания 0,5 DLM токсина кроликам; 3) путем определения смертельной для морских свинок при уколах в сердце дозы токсина. Кроме того определялись размеры некротизирующей дозы токсина при внутрикожном впрыскивании кроликам. Специфичность этих изменений мы определяли, вводя в кожу дифтерийный токсин в разведении 1 : 1000, 10% раствор CaCl₂ и неравведенный алкоголь.

Результаты

После введения небольшой дозы стафилококковой инфекции наблюдаются значительные изменения устойчивости по отношению к реинфекции через 24 часа смертельной дозой культуры стафилококков. При этом получаются разные результаты в зависимости от того, применялась ли для предварительной инфекции вирулентная — или неvirulentная культура.

После введения небольшой дозы (10—20 миллионов микробов) вирулентной культуры Wood A создается повышенная устойчивость по отношению к стафилококковой инфекции. Опытные животные выживают гораздо дольше, или даже совсем не погибают, тогда как контрольные погибают большей частью в течение суток (табл. 1). При этом количества микробов в крови, количество лейкоцитов в крови и количество микробов в органах контрольных и подопытных животных, убивавшихся нами через различные промежутки времени после инфекции, бывали в общем одинаковыми. Пример одного из опытов приводится на табл. 2.

После подготовительной инфекции небольшой дозой вирулентной стафилококковой культуры устойчивость по отношению к инфекции другими микробами не повышается, как доказывают наши опыты с реинфекцией стрептококками, паратифом и кишечной палочкой. Количество микробов в крови

Табл. 1. Время смерти (в часах) после внутривенной стафилококковой инфекции кроликов — опытных и контрольных. 0 — устойчивое выживание.

	Контроль			Подопытные животные				
Заражение 3 DLM	20	24	24	48	65	72	72	96
	24	30	38	120	144	144	204	0
Заражение 1,5 DLM	40	72	72	96	120	216	0	0
	120			0	0	0		

Табл. 2. Количество микробов в крови и органах подопытных и контрольных кроликов. Инфекция 0,5 DLM. Животные убивались через 12 час. после начала опыта.

	Контроль			Подопытные животные		
Микробов в 1 мл крови через						
1 час	165	144	32	75	115	54
2 часа	—	41	34	103	63	14
4 часа	26	39	43	—	38	16
6 часов	12	8	12	2	7	11
12 часов	0	6	2	0	4	0
Микробов в 10 мг органа						
печень	6	5,5	—	2,8	6	1,5
легкие	1,8	1,1	—	5	1,5	3,7
селезенка	4	6,5	—	3	7,2	5,5
надпочечники	1,7	0	—	2,5	1,6	1

бывает опять-таки одинаковое у подопытных и контрольных животных. Равным образом инфекция небольшой дозой всех этих микробов не изменяет степени устойчивости подопытных животных к реинфекции стафилококками.

Совершенно иные результаты были нами получены при опытах со слабовирулентными культурами Wood B. Для предварительной инфекции мы применяли здесь дозы в 200—500 миллионов микробов. Реинфекция производилась опять-таки культурой штамма Wood A, у которого вполне смертельная доза составляла 100—200 миллионов микробов. Мы убедились, что в этом случае подопытные животные быстрее, чем контрольные, выделяют микробы из крови. Уровень лейкоцитов у них бывает повышен, а в органах после умерщвления находится только приблизительно половинное количество микробов в сравнении с контролем. Возникающая при этом устойчивость бывает сравнительно очень невелика. Пример одного из таких опытов приводится на табл. 3.

Таб. 3. Течение внутривенной стафилококковой инфекции (1 DLM) у кроликов после предварительного впрыскивания большой дозы невирулентной стафилококковой культуры.

	Контроль				Подопытные животные			
Количество микробов в 1 мл крови через								
1,5 часа	559	1300	58	210	49	32	10	125
3 часа	75	198	10	29	12	4	2	—
20 часов	588	129	750	39	135	400	1	—
Количество лейкоцитов в крови до и после инфекции								
—24 часа	6000	5100	6450	10800	4500	9450	4700	7400
в момент инфекции	8200	7800	5100	8900	4900	7800	5650	6300
+4 часа	3350	510	3200	5650	6300	6300	5700	—
+20 часов	4100	4400	2450	4200	6400	7200	7800	—
Смерть наступила через	2 дня живет	3 дня живет			живет 5 дней	живет		—

Незначительное повышение устойчивости, наблюдающееся после введения большой дозы маловирулентных микробов стафилококка, оказывается неспецифическим: если реинфекция производится с помощью культуры стрептококков, пневмококков, паратифа или *E. coli*, то также наблюдается незначительное повышение устойчивости, причем и эти микробы выделяются из крови подопытных животных быстрее, чем в контроле. Подобные изменения (лейкоцитоз, ускорение очистки крови от микробов и незначительное повышение устойчивости) можно вызвать, и впрыскивая за 20 часов до стафилококковой инфекции 1 мл бульона.

При своих дальнейших опытах мы проверяли, имеются ли 2 различных типа реакции и у других штаммов стафилококков. Мы производили опыты с 4 штаммами в 11 комбинациях (в общем свыше 50 животных) и нашли опять те же соотношения, как и при предшествовавших опытах: предварительная инфекция небольшой дозой вирулентной культуры вызывает устойчивость при неизменной динамике количества микробов в крови в течение инфекции; если же для подготовительной инфекции применяется большая доза маловирулентной культуры, то возникает лишь незначительная устойчивость, хотя микробы часто выделяются из крови быстрее, чем в контроле. Часто встречаются и реакции переходного типа.

Если в качестве предварительной инфекции впрыскивается маловирулентная культура, но в небольшой дозе (10—20 миллионов микробов), то это не оказывает влияния на последующую стафилококковую инфекцию. Если же вместо предварительной инфекции впрыскиваются убитые микробы (стафилококковая вакцина), то оказывается, что после небольшой дозы вакцины из вирулентного штамма изменений устойчивости не наблюдается, а после большой дозы вакцины из маловирулентного штамма наступают такие же изменения, как после впрыскивания живых микробов того же штамма.

Принципиальная разница между обоими типами реакций проявляется и в изменениях антитоксической активности: после небольшой дозы вирулентной культуры повышения антитоксической устойчивости не наблюдается, напротив, — после большой дозы маловирулентной культуры или после впрыскивания бульона возникает антитоксическая (по всей вероятности неспецифическая) реакция, как показывает табл. 4.

Таб. 4. Антитоксические изменения через 24 часа после подготовительной инфекции культурами равной степени вирулентности.

	Предварительная подготовка		Контрольные животные	Всего животных в опыте
	Небольшая доза вирулентной инфекции	Большая доза невирулентной инфекции		
DLM токсина внутривенно	0,3 мл	0,7 мл	0,3 мл	68
Антитоксический титр сыворотки	1/24 — 1/32 ед.	1/8 — 1/16 ед.	1/24 — 1/32 ед.	12
Свободный токсин через 10 мин. после внутривенного введения в титре	1 : 3 — 1 : 4	0 — 1 : 2	1 : 3 — 1 : 4	12

Впрыскивая внутривенно различные дозы стафилококкового токсина и контрольных веществ, мы получили результаты, указанные в табл. 5. Предварительная инфекция большой дозой маловирулентной культуры, как и введение большой дозы стафилококковой вакцины или впрыскивание бульона, вызывает общее неспецифическое повышение устойчивости по отношению к вводимому внутривенно стафилококковому или дифтерийному токсину и остальным раздражителям. Небольшая доза предварительной вирулентной инфекции вызывает изменения, специфические только для стафилококкового токсина: ослабляется воспалительная реакция на впрыскиваемый токсин, но, с другой стороны, усиливаются и учащаются стафилококковые некрозы, тогда как реакции на неспецифические импульсы не меняются.

Дискуссия

Не позже 24 часа после введения кроликам стафилококков у них наблюдаются изменения реактивности, отвечающие понятию «депрессивного иммунитета». При этом мы наблюдали 2 типа реакции, — в значительной степени противоречивых, — в зависимости от того, какая культура стафилококков применялась для подготовительной инфекции.

Один тип реакции проявляется в мобилизации лейкоцитов, ускоренной очистке крови от впрыснутых микробов, в повышении антитоксической устой-

Таб. 5. Реакция контрольных и подопытных кроликов на внутрикожное впрыскивание стафилококкового токсина и различных других веществ

	Предварительная подготовка		Контроль
	Небольшая доза вирулентной инфекции	Невирулентная инфекция, вакцина, бульон	
Всего животных	26	19	33
Доза токсина, вызывающая воспаление	1 : 300 — 1 : 500	—	1 : 1000 — 1 : 2000
Доза токсина, вызывающая некроз	1 : 200 — 1 : 300	1 : 10 — 1 : 20	1 : 50 — 1 : 100
Размеры воспаления и некроза под влиянием дифтерийного токсина, спирта и CaCl_2	∅ 15 - 20мм	∅ 6 - 10мм	∅ 15 - 20мм

чивости и в небольшом повышении устойчивости по отношению к смертельной дозе стафилококков. Этот тип реакции наблюдается после введения дозы в несколько сот миллионов маловирулентных микробов, а также после аналогичной дозы стафилококковой вакцины и после впрыскивания бульона. Создающаяся таким образом устойчивость не специфична и наблюдается и в случае реинфекции другими микробами. Это отвечает общеизвестным фактам о влиянии неспецифических импульсов (молока, крови, сыворотки, экстрактов микробов, нуклеиновых кислот, белков) на противозаразную устойчивость, используемым под названием «протеиновой» или «импульсной» терапии (Petersen 1923, Jelin 1926, Philipson 1937, Bieling 1944, Зильбер 1948 и др.).

Второй тип реакции бывает после небольшой дозы (только десятки миллионов микробов) вирулентной стафилококковой культуры, но не бывает после вакцины или после небольшой дозы маловирулентной культуры. Так создается специфическая по отношению к стафилококковой инфекции устойчивость, не сопровождающаяся ни повышением выделения микробов из организма и их уничтожением, ни повышением антитоксической устойчивости.

Такие же результаты при тифозной инфекции получили Teague и McWilliams (1917), которые сообщают, что через 24 часа после впрыскивания антитифозной вакцины создается устойчивость по отношению к инфекции, не сопровождающаяся переменами в отмывании микробов из крови или в степени бактерицидности крови *in vitro*. Ferina и Messina (1954) приводят, что под действием небольшой дозы стафилококковой инфекции бактерицидная способность тканей и органов не меняется. Bernheimer и Cantoni (1947) сообщают, что через 24 часа после введения небольшой дозы стрептолизина у подопытных животных наблюдается специфическая, — но не зависящая от действия антител, — устойчивость по отношению к смертельной дозе того же яда. Подобным образом возникает и при отсутствии антител устойчивость к столбнячной интоксикации или к заражению риккетсиями или коклюшем вскоре после введения больших доз соответственного анатоксина или вакцины (Edsall 1955, Иогановский 1956).

Результаты, полученные нами при внутрикожном введении стафилококкового токсина и других раздражающих веществ, требуют объяснения. После большой дозы невирулентной культуры наблюдается общее неспецифическое повышение активности соединительной ткани, а вместе с тем и уменьшение интенсивности

всех реакций. Под действием небольшой дозы вирулентной культуры возникают специфические изменения мнимо парадоксального характера: ослабление воспалительной реакции и учащение случаев некроза. Это противоречие можно объяснить тем, что токсин стафилококка действует в двух направлениях: во-первых, как импульс для воспалительной (по всей вероятности, рефлекторной) реакции организма и, во-вторых, непосредственно своим некротизирующим влиянием на клетки и ткани (Йогановский 1956). Повидимому, полученные нами результаты можно объяснить тем, что воспалительная реакция на токсин стафилококка в этом случае ослабляется, и поэтому могут развиваться обширные зоны некроза.

Обобщая, можно сказать, что в ходе стафилококковой инфекции возникает состояние невосприимчивости, устойчивости по отношению к новой дозе того же заразного начала. Нам удалось доказать, что это — не обычные механизмы антимикробного и антитоксического иммунитета. На основании нашего материала трудно судить, какие метаболические, вегетативно-гормональные или регуляторные функции организма принимают участие в этих реакциях. Только в качестве рабочей гипотезы можно предполагать наличие изменений интерорецептивной чувствительности организма к токсическим антигенам, известным по работам Адо (1951, 1952) и Рашковой (1952, 1955). Эту гипотезу подтверждают и полученные нами здесь результаты, и наши прежние работы, в которых мы доказали, что при повторяющихся столкновениях организма с токсинами микробов наступают глубокие и специфические изменения его восприимчивости и без участия антитоксических механизмов (Йогановский 1956). По своему содержанию эти наблюдения скорее всего подходят под понятия «незаболевания» Сперанского (1952, 1953) и «патогенетического иммунитета» (Адо 1952, Павленко 1953). Конечно, необходимо продолжать исследования, чтобы эти гипотезы получили подтверждение в непосредственном экспериментальном материале, а в особенности для выяснения отношения между этими изменениями, очевидно несущими общий и регулирующий характер, и общеизвестным непосредственно токсическим действием токсина стафилококка на сердце и легочные сосуды (Kellaway, Burnet, Williams 1930, Еникеева 1952, Малек 1954).

В заключение мы хотели бы подчеркнуть, что, если мы и описывали оба типа реакции в отдельности, то их частое сосуществование и взаимодействие несомненны, и мы сами это наблюдали. В зависимости же от условий опыта преобладало или неспецифическое действие белковой массы большого количества мало-вирулентных микробов, или глубокие и специфические изменения чувствительности в ходе развития инфекционного процесса, вызванного небольшой дозой вирулентной культуры.

Резюме

1. Мы подвергли анализу явление т. н. депрессионного иммунитета (Morgenroth). Пользуясь внутривенной стафилококковой инфекцией и реинфекцией кроликов, мы исследовали у них количество лейкоцитов, количество микробов в крови и в органах, общие и местные антитоксические механизмы, как и их серологические проявления и специфичность вызываемых инфекцией изменений.

2. Под действием большой дозы мало-вирулентной культуры стафилококков, как и стафилококковой вакцины и бульона, наблюдается неспецифическое повышение устойчивости против инфекции, сопровождающееся лейкоцитозом, усилением выделения микробов и повышением антитоксической устойчивости.

3. В течение инфекционного процесса, вызываемого небольшой дозой вирулентной культуры стафилококков, развивается невосприимчивость к новой

стафилококковой инфекции, не имеющая характера антимикробного или анти-токсического иммунитета и оказывающаяся строго специфической.

4. Оценивается частота встречаемости и биологическое значение обоих типов реакции при различных условиях опыта. Рассматриваются возможные механизмы их возникновения. Реакция первого типа отвечает данным относительно импульсной протеинотерапии. Реакция второго типа возникает, вероятно, в результате воздействия на общие регулирующие механизмы в организме.

Л и т е р а т у р а

- А до, А. Д.: Учение И. П. Павлова и современная иммунология. Сб. Учение И. П. Павлова в теоретической и практической медицине. Москва 1951.
- А до, А. Д.: Антигены как чрезвычайные раздражители нервной системы. Москва 1952.
- В ы г о д ч и к о в, Г. В.: Микробиология и иммунология стафилококковых заболеваний. Москва 1950.
- Е н и к е е в а, С. И.: О характеристике степени токсичности стафилококкового токсина и устойчивости к нему изолированного сердца в различные возрастные периоды. Заболевание, лечение и выздоровление. Москва 1952.
- З и л ь б е р, А. А.: Основы иммунитета. Москва 1948.
- К р ы л о в, В. Н.: Депрессионный иммунитет (по Моргенроту) в эксперименте. ЖМЭИ № 2, 1947.
- П а в л е н к о, С. М.: О работе пленума правления Всесоюзного общества патофизиологов. ЖВНДИП 3: 304, 1953.
- С п е р а н с к и й, А. Д.: Введение. Заболевание, лечение и выздоровление. Москва 1952.
- С п е р а н с к и й, А. Д.: Борьба с вихорвианством в биологии и медицине. Сб. Учение И. П. Павлова в теоретической и практической медицине II. Москва 1953.
- B e r n h e i m e r, A. W., C a n t o n i, G. L.: The Toxic Action of Preparations Containing the Oxygen-labile Hemolysin of *Streptococcus pyogenes*. III. Induction in Mice of Temporary Resistance to the Lethal Effect of the Toxin. *J. Exp. Med.* 86 : 193, 1947.
- B i e l i n g, R.: Die biologische Infektionsabwehr des menschlichen Körpers. Wien 1944.
- B o r d e t, J.: Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Paris 1939.
- E d s a l l, J. T.: Immunisation. *Ann. Rev. Microbiol.* 9 : 180, 1955.
- F e r i n a, F., M e s s i n a, L.: Infezione stafilococcica sperimentale a reinfezione. *Giorn. Batt. Immunol.* 47 : 108, 1954.
- J e l i n, W.: Studien über den Mechanismus der natürlichen Immunität. *Cbl. Bakter.* 98 : 411, 1926.
- J o h a n o v s k ý, J.: Reaktivita organismu při infekci a intoxikaci. Rozpravy ČSAV 1956, v tisku.
- J o h a n o v s k ý, J.: Vztah imunity a sensibility při experimentální stafylokokkové infekci. *Čas. lék. českých* 94 : 455, 1956.
- K e l l a w a y, C. H., B u r n e t, F. M., W i l l i a m s, P. E.: The Pharmacological Action of the Exotoxin of *Staphylococcus aureus*. *J. Pathol. Bact.* 33 : 889, 1930.
- M á l e k, P.: Nitrotepenné podávání penicilinu. *Thomayerova sb.* 334, 1954.
- M o r g e n r o t h, J., B i b e r s t e i n, H., S c h n i t z e r, R.: Die Depressionsimmunität. Studien über Superinfektion mit Streptokokken. *D. med. Wochenschr.* 10 : 337, 1920.
- M o r g e n r o t h, J., A b r a h a m, L.: Depressionsimmunität bei intravenöser Superinfektion mit Streptokokken. *Zschr. Hyg. Infkr.* 94 : 163, 1924.
- P e t e r s e n, W. F.: Proteintherapie und unspezifische Leistungssteigerung. Berlin 1923.
- P h i l i p s o n, J.: Experimental Studies on Enhanced Resistance to Infection Following some non Specific Measures. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl.* 32, 1937.
- R a š k o v á, H., R a š k a, K., M a t ě j o v s k á, V., R y b o v á, B.: Některé vlastnosti toxinu *Sh. shigae*. *Čas. lék. českých* 91 : 612, 1952.
- R a š k o v á, H., R a š k a, K., M a t ě j o v s k á, V., R y b o v á, B.: Některé vlastnosti tyfového endotoxinu. *Čs. hyg. epid. mikr.* 4 : 450, 1955.
- T e a g u e, O., M c W i l l i a m s, H.: *J. Immunol.* 2 : 185, 1917, cit. J. Philipson, 1937.

The Phenomenon of Resistance in the Course of Experimental Staphylococcal Infection

J. JOHANOVSKÝ

Summary

1. The phenomenon of "Morgenroth's depressive immunity" was subjected to analysis. In intravenous staphylococcal infection and reinfection in rabbits a study was made of the level of leucocytes, the number of micro-organisms in the blood and organs, general and local antitoxic mechanisms and their serological manifestations, and the specificity of the changes produced.

2. Following a large dose of a slightly virulent culture of staphylococci, after staphylococcal vaccine or broth, a nonspecific increase in resistance to infection develops, accompanied by leucocytosis, increased clearing of the micro-organisms from the blood and organs and an increase in antitoxic resistance.

3. In the course of the infective process evoked by a small dose of virulent culture of staphylococci, resistance to new staphylococcal infection develops. This resistance has the character neither of antibacterial nor of antitoxic defence and is strictly specific.

4. An evaluation is made of the incidence and biological significance of both types of reaction under various conditions and the possible mechanisms of their origin are discussed. A reaction of the first type corresponds to findings with protein therapy, a reaction of the second type is probably due to the influencing of the regulatory mechanisms of the organism in general.

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 3

Unusual Forms of Variability in *Trichophyton mentagrophytes*

M. HEJTMÁNEK and N. HEJTMÁNKOVÁ-UHROVÁ
Institute of Biology, Medical Faculty of Palacký University, Olomouc

Received February 16, 1956

The diagnosis of dermatomycosis is made difficult by the lack of unity in the taxonomy and by the broad synonymy of skin fungi (Vanbreuseghem 1952). The main reason for this is the wide variability in the characteristics of fungus colonies. Their manifestations are manifold — in addition to polymorphism and pleomorphism, other changes are also known which are acquired by the colony during passaging in vitro and which can be very stable or even inherited (Grütz 1924, Kashkin 1954). The causes of the development of unusual manifestations of variability in colonies of dermatophytes can vary. One of them is prolonged culturing of the colony, without reinoculation, on the same nutrient medium. So many different factors participate in this (e.g. drying of the substrate, cumulation of metabolic products, changes in pH, degree of humidity of the air, etc.) that it is very difficult to analyse the decisive factor *ex post* (Kashkin 1954).

Under conditions of prolonged culturing, without reinoculation, of one strain (A) of the fungus *Trichophyton mentagrophytes* Emmons 1934 (Synonym: *Ctenomyces interdigitalis* Priestley 1917, *Trichophyton Kaufmann-Wolf* Ota 1922, etc.) the development of unusual forms of the mycelium (the development of coremia) was observed on the surface of dried-up colonies (fig. 1, tab. XV, fig. 1, 2). These grew in mixed culture of colonies of the same strain (A) on a Sabouraud agar-glucose medium (SGA). Two months before the formation of coremia, the antimycotic action of dehydrochloramphenicol had been tested on these colonies. The macro- and microscopic structure and a detailed description of this mass development of coremia are given in a separate publication (1955). It is considered by us to be a special convergent manner (Langeron and Vanbreuseghem 1952) of the adaptation of old colonies to generally unfavourable conditions of protracted culturing without reinoculation, which acted in a certain chronological order and intensity. The circumstances which demonstrate the development of these coremia from the mycelium *Trichophyton mentagrophytes* (A) is discussed in greater detail in a separate publication (1956a). Although attempts were made to reproduce the conditions under which development of these coremia occurred in old, woolly colonies (A), we were not successful in activating the original woolly strain (A) to fresh formation of coremia.

By isolating spores from the coremia (B) a pure culture of this unusual form of the fungus was obtained (C). This was cultured at 25°C in an atmosphere of a relative humidity of 75—80 % on a Sabouraud medium with glucose in macrocultures or in microcultures according to the method of Rivalier and Seydel (1932). By culturing in many prolonged passages (up to as much as eight months) and by inoculating with various parts of the mother colony (e. g. spores, mycelia from the centre, edge of the colony, etc.) a series of subcultures was obtained (fig. 2). It was found that in

subcultures C_{1-2} to G_{1-7} , the development of coremia took place regularly and cyclically, via a series of forms (for further details v. our communication 1956a).

On reinoculation, substrate colonies of a brownish colour, without an aerial mycelium, grew out of the coremia, spreading immediately below and above the surface of the semi-solid medium (tab. I, fig. 3). With aging they changed as a rule (though this is not a condition) into waxy, cerebriform forms, which on sporulation changed into forms with a white, granular surface. On the surface of the white gran-

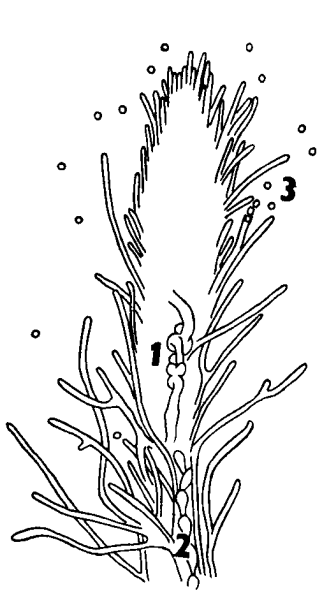


Fig. 1. Diagram of coremia, 1 : nodular bodies, 2 : cells of raquet mycelium, 3 : spores.

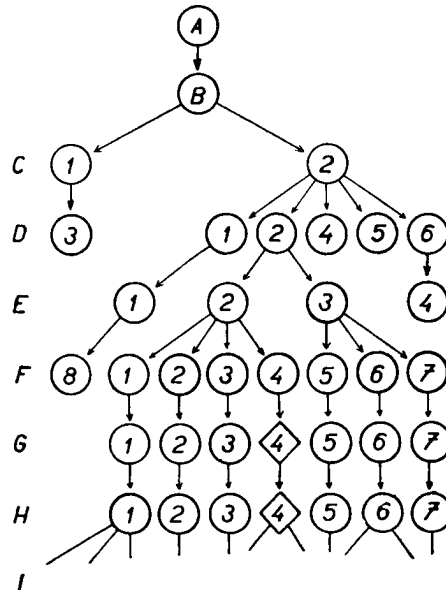


Fig. 2. Diagram of passages of subcultures Small squares denote faviform type of colony.

ular forms of colonies, heaps of a short, woolly white mycelium were formed, measuring 1—3 mm. in diameter; (tab. XV, figs. 5 and tab. XVI, figs. 5, 7); these consisted of heaped, sporulating hyphae, similar to those which formed the white, granular surface of the preceding form. In some cases, directly column-shaped coremia developed from the heaps or, after reinoculation, a substrate mycelium and from this, by aging, cerebriform heaps and finally coremia. Coremia developed directly in the substrate forms to a small extent only, and even then only on the inoculum. In most cases the development of coremia was linked up with a preceding form of white heaps, from which coremia developed most profusely and most frequently. It is worthy of note that coremia developed in the sequence of passages C to H less profusely than the other forms of the mycelium which have been described (chiefly substrate forms). On the other hand, in the sequence of subcultures of passage I and others, preponderance of the development of coremia occurred and its development was accelerated in such a manner that in many cases a white, short cotton-like mycelium grew out of the inoculum and, directly from this, tufts of coremia; the short, cotton-like mycelium evidently corresponds to the mass mutual development of the merged heaps of the preceding forms. Apart from their macroscopic appearance, the individual forms of the mycelia also differed by the type of the spores. The original, woolly form (A) was characterised by aleuria, coremia by arthrospores and the granular form and heaps by chlamydo spores.

Coremia, the substrate colonies, the heaps of short cottony mycelium and the cerebriform forms observed by us, developed without any intentional influence, i. e. they developed "spontaneously". In a sequence of passages, under the conditions given above, a further faviform type of colony developed, in a similar way to the forms of colonies already described.

From fragments of the periphery of the white, granular mycelium of subculture F_4 producing coremia, subcultures of G_4 developed after reinoculation; these had a faviform character (for more detailed information v. our communication 1956b). When young, they were creamy white to brownish yellow, of a compact, waxy appearance and of a friable consistency (tab. II, fig. 1a, 1b, 2). They protruded above the nutrient substrate, which sometimes cracked beneath them. The colonies grew directly into the substrate, without transition. Neither the base of the colonies nor the medium was pigmented. With aging (after 25—30 days, but not in every case), the surface of the colonies acquired marked white granulations of a powdery to gritty appearance, which spread centrifugally and more or less hid the cerebriform appearance of the colony.

On microscopic examination, mainly bent hyphae and chains of chlamydo-spores or solitary chlamydo-spores were found in a young (6 days') faviform colony. In an old colony (22 days), smaller chlamydo-spores were found, arranged like a rosary, with straight, branched hyphae, which at the periphery of the colony terminated in strikingly developed candelabra- and antler-like formations ("favic chandeliers"). In places, pectinate bodies were also found. These characteristics were found in the basal parts of the old colony. In the surface parts, the mycelium turned into irregular, branching hyphae with a profusion of conidia measuring 4—8 μ . They were inserted directly or by a stem. In places there were again chains of chlamydo-spores. Macroscopically, sporulation of the old culture was seen as a white, fine granulation of the surface of the colony. It is interesting that the colonies of G_4 , after ten passages, turned into forms of colonies which, while furrowed in the cerebriform manner, had a granular to short, cottony, white surface. Under the given conditions they had a typically waxy, faviform character in the first to second week of culturing.

The linear rate of growth of the faviform colonies was 80% lower than the rate of growth of the woolly aerial colonies of the original strain (A). It was found that optimal growth of the original colony (A) was obtained on a medium with 4% glucose. Optimum growth for faviform colonies was on a medium with 10% glucose. On substrates with a 10—30% glucose content, more intensive development of chlamydo-spores occurred in faviform colonies (G_4), the chlamydo-spores being frequently of enormous dimensions (diameter up to 35 μ). At the same time, however, on these media the colonies became greyish-beige in colour and short and cottony. In one case the mass development of coremia of the usual structure was observed in a subculture of G_4 on a medium with 10% glucose (1956 b). In preliminary experiments the considerable influence of the pH of the substrate on the character of the colonies of a subculture of G_4 and on some other subcultures was established. On acid media the colonies maintained a faviform character.

In order to verify the pathogenicity of subcultures of G_4 , they were used to infect mice and guinea-pigs. In mice the result was completely negative: in two guinea-pigs out of ten, formation of a lesion, covered by a crust about 1 cm. in diameter, occurred, with falling-out of the hairs. Microscopically, only spores were found in the scales, some of which were budding.

Macromorphologically and microscopically, the characteristics of the faviform colonies of G_4 are identical with the descriptions of colonies of *Trichophyton* (*Achorion*) *schönleini* (Alexander et al. 1928, Dočekal and Dvořák 1954, Gohar 1948, Chmel et al. 1954, Lewis and Hopper 1948, Kashkin 1954, Kolmer and Boerner

1945, Obrtel 1936, 1950). The results confirm the assumption of the existence of developmental relationships between colonies of dermatophytes which are often described as separate "species". Similar conclusions can be drawn from the work of Emmons and Hollaender (1939), Hruszek (1937), Majewski (1953), Kashkin (1949, 1954), Sigalova (1951) and others. Paldrok (1953) in particular deals with them in detail and arrives at the conclusion that all dermatophytes should be considered as existential forms, stages of only three species, belonging to a single genus—*Microsporum*.

In many descriptions of processes of the transformation of one skin fungus into another (Kashkin 1954, Paldrok 1953), the lability of even diagnostically significant characteristics of colonies of fungi is demonstrated (sporulation, pigmentation, type of colony, etc.). The correct interpretation of these manifestations is still, however, a problem. Langeron and Vanbreuseghem (1952) regard faviform colonies ("les colonies glabres") as degenerative forms, produced by laboratory conditions (v. ref. p. 406). Sigalova regards the conversion of a colony of one "species" of skin fungus into a colony with characteristics of another "species" as true interspecific transformation and even as the development of a new species within the old one (Kashkin 1954, p. 77). Paldrok (1953) regards the transition of a colony of one "species" of fungus into a colony of another "species" as evidence that both belong to a same common species; that is why he reduces the number of species. From this it is evident that various authors interpret the facts of the variability of dermatophytes in various ways, because their different approach to the question of what constitutes a "species" and to its criteria in medical mycology is different. In our opinion, the transformation of the original woolly aerial colony of *Trichophyton mentagrophytes* (A) into coremia and into faviform colonies of the type of *Trich. (Achorion) schönleini* cannot be taken as proof of the conversion of one type of skin fungus into another, simply because objective and generally acknowledged criteria for types of skin fungi are not yet known. Nor is enough yet known about the potential range of variation of their forms.

It is obvious that the study of variability is gradually throwing light on the evolutionary relationships between the various "species" of dermatophytes, to the detriment of the classical monomorphism. It also places cases of mycotic diseases of the type of a mixed infection in a new light (Blank 1951, Frank and Rosenbaum 1950, Muskatblit 1941, Schwartz 1942, Vilanova and Casanovas 1954, Vanbreuseghem and Moriamé 1948, ect.), for which Langeron and Vanbreuseghem (1952 p. 573) are unable to find a satisfactory explanation. It lends support to the dynamic point of view in medical mycology: it rightly emphasizes the relationship of properties of form and physiology of an isolated strain of fungus to the conditions of its present environment and to the conditions to which it adapted itself in previous "generations". This is demonstrated in another group of fungi (breaking down lignocellulose cell membranes) by the results of Felklová and Rypáček (1954), Hejtmánek and Rypáček (1953) and Tichý and Rypáček (1953). In our opinion, all manifestations of variability can be understood in the same way, as far as their general features are concerned, as the outcome of adjustment of contradiction between the demands of the fungus on the environment, which had become hereditarily fixed in its preceding "generations" by the process of adaptation, and the complex of different conditions in its present environment. This interdependence of ontogenesis and phylogenesis is emphasized from the historical aspect in an exposé on the general causes of the variability of dermatophytes (Gawalowski 1955). It is seen to be all the more justified if the peculiarities of the biology of dermatophytes are considered in relationship to their probable saprophytic origin (Ajello 1953) and hence, therefore, to the facultative character of their parasitism.

Summary

Under the influence of prolonged culturing without reinoculation, coremia grew out of woolly aerial colonies of a strain (A) of *Trichophyton mentagrophytes* Emons 1934. Their development is considered as a special form of convergent adaptation to the exceptional conditions of the environment (1955).

By the inoculation of various parts of colonies which grew out of spores isolated from the coremia (B), series of subcultures were obtained by passaging (fig. 2). These were cultured for a long period on a Sabouraud agar with glucose at 25 °C and every one was kept under observation for up to eight months (1956a).

After reinoculation into further passages (C_{1-2} to G_{1-7}), the spores of the coremia grew into substrate colonies which spread immediately above and below the substrate. On aging (sporulation) they acquired a fine, white, granular surface, on which heaps of a short, white cotton-like mycelium were finally formed, 1—3 mm. in diameter; from these coremia developed. If the heaps were reinoculated, either coremia grew out of them directly, or first of all substrate colonies appeared, from which new, granular heaps were formed and only then coremia. In the microscopic picture, the original woolly form (A) was characterised by aleuria, coremia by arthrospores and the granular form and heaps by chlamydospores. In subcultures of the series J and others, the developmental cycle was shortened, in that, in many cases a short, cottony white mycelium grew out of the transferred inoculum and from this tufts of coremia grew directly.

All forms of colonies developed without any planned influence. In a similar way, in a "spontaneous" manner, the development of faviform colonies (labelled G_4) occurred in a sequence of passages (1956b). These grew out of a fragment of the periphery of a white granular mycelium of the subculture F_4 . Macro- and microscopically the characteristics of these faviform colonies of G_4 are the same as those of *Trichophyton (Achorion) schönleini*—a waxy consistency, cerebriform furrowing of the surface, growing into the substrate, chains of chlamydospores, "favic chandeliers", pectinate bodies, etc. After 10 passages it was observed that the waxy consistency was maintained only during the first 14 days of culturing and that their surface then acquired white granularity, which turned into a short, cottony, white mycelium. Their linear rate of growth was 80% lower than the rate of growth of the original woolly aerial strain (A). Optimal growth occurred on a substrate with 10% glucose. On media with a higher glucose content, colonies of G_4 with a short, cotton-like mycelium of a greyish beige colour grew, in which a profusion of chlamydospores measuring up to 35 μ was found. In one case, coremia again developed from faviform colonies of G_4 growing on a substrate with 10% glucose. Colonies of G_4 were not pathogenic for mice. In two out of 10 experimental guinea-pigs, the result of infection with a colony of G_4 was vaguely positive.

The work confirms the assumption that developmental relationships exist between colonies of various types of dermatophytes (Paldrok 1953). This opens the question of the actual existence and criteria of species in medical mycology; which can be resolved by a study of the natural and experimental variability of dermatophytes. In our view, all manifestations of variability can be generally understood as the result of adjustment of the contradiction between the specific requirements of the fungus, which were fixed in its preceding "generations" by the process of adaptation and the complex of differing conditions of its present, non-specific environment. There are so far no known objective and generally recognised criteria of species of skin fungi, nor is the extent of the variation of their forms known; the

transformation of woolly aerial colonies of *Trich. mentagrophytes* (A) into faviform colonies of the type of *Trich. (Achorion) schönleini* cannot therefore be regarded as the transition of one species of fungus into another.

(*Plates XV, XVI*)

Literature

- Ajello, L.: The Dermatophyte *Microsporum gypseum* as a Saprophyte and Parasite. *J. Invest. Derm.* 21 : 157, 1953.
- Alexander, A. et al.: *Dermatomykosen*. 9. Bd. Handb. Haut- Geschlechtsk. Berlin 1928.
- Blank, F.: Über mykotische Mischinfektionen. *Dermatologica* 102 : 92, 1951.
- Bruhns, C., Alexander, A.: *Grundriss der mykologischen Diagnostik*. Berlin 1932.
- Brumpt, E.: *Précis de Parasitologie*. Paris 1949.
- Conant, N. F., Martin, D. S., Smith, D. T., Baker, R. D., Callaway, J. L.: *Manual of Clinical Mycology*. Philadelphia — London 1944.
- Dočekal, B., Dvořák, J.: *Příručka lékařské mykologie*. Praha 1954.
- Emmons, C. W., Hollaender, A.: *Am. J. Bot.* 27 : 467, 1939 (Acc. to Paldrok 1953).
- Felková-Němcová, M., Rypáček, V.: Vzájemné vztahy hub rozkládajících lignocelulosní blány buněčné. Vliv teploty na sukcesní vztahy při pochodech humifikačních. *Spisy přírodovědecké fakulty MU v Brně*, č. 355, 1954.
- Fränck, A. G., Rosenbaum, E. M.: Benign Course of Dermatophytosis Due to Combined Infection with *Epidermophyton floccosum* and *Trichophyton rubrum*. *Arch. Dermat. Syph.* 62 : 439, 1950.
- Gawalowski, K.: *Obecná dermatologie*. Praha 1955.
- Gohar, N.: *Mycoses and Practical Mycology*. London 1948.
- Grütz, O.: Über Variabilität pathogener Hautpilze. *Zbl. Bakter. Parasitenk. Infektionskr. Orig.* 93 : 268, 1924.
- Hejtmánek, M., Hejtmánková-Uhrová, N.: Vývoj polymorfních kolonií *Trichophyton Kaufmann-Wolf*. *Čs. biologie* 5 : 163, 1956a.
- Hejtmánek, M., Hejtmánková-Uhrová, N.: Transformace vzdušné chmýřité kolonií kožní plísně *Trich. Kaufmann-Wolf* ve faviformní kolonie. *Čs. biologie* 5 : 171, 1956b.
- Hejtmánek, M., Rypáček, V.: Mezidruhové vztahy dřevokazných hub studovány in vitro. *Spisy přírodovědecké fakulty MU v Brně*, č. 350, 1953.
- Hejtmánková-Uhrová, N., Hejtmánek, M.: Vznik koremií v kultuře *Trichophyton Kaufmann-Wolf*. *Čs. mykologie* 9 : 14, 1955.
- Hruszek, H.: *Dermatol. Wochenschr.* 104 : 689, 1937 (Acc. to Paldrok, 1953).
- Chmel, L. et al.: *Laboratorne vyšetřovací metody v dermatologii a venerologii*. Bratislava 1954.
- Kolmer, J. A., Boerner, F.: *Approved Laboratory Technic*. New York — London 1945.
- Langeron, M., Vanbreuseghem, R.: *Précis de mycologie*. Paris 1952.
- Lewis, G. M., Hopper, M. E.: *An Introduction to Medical Mycology*. Chicago 1948.
- Majewski, C.: W sprawie zmienności morfologicznej grzyba strzygadcego (*Trichophyton gypseum granulorum*). *Przegląd dermatol. i venerol.* Nr. 3 : 340, 1953.
- Muskatblit, E.: Combined Fungous Infections. *Arch. Derm. Syph.* 44 : 631, 1941.
- Obrtel, J.: *Dermatophyta*. Praha 1950.
- Obrtel, J.: Morfologické a biologické vlastnosti kožních plísní v Praze se vyskytujících. *Čs. dermatol.* 16 : 193, 1936.
- Paldrok, H.: On the Variability and Classification of Dermatophytes. *Acta Dermatovenerol.* 33 : 1, 1953.
- Rivalier, E., Seydel, S.: Structures minces sur lames gélosées, colorées et examinées in situ en préparations définitives pour l'étude de cryptogames microscopiques. *C. R. Soc. Biol.* 110 : 181, 1932.
- Schwartz, J. H.: *Tinea versicolor, Tinea corporis and Tinea cruris*. *Arch. Dermat.* 43 : 561, 1941. Ref.: *Zbl. Haut- Geschlechtsk.* 68 : 115, 1942.
- Tichý, V., Rypáček, V.: Vliv stanoviště na fungistatické schopnosti lišejníků. *Spisy přírodovědecké fakulty MU v Brně*, č. 346, 1953.
- Vanbreuseghem, R.: Est-il possible d'améliorer la nomenclature et la classification des dermatophytes? *Mycopathologia et Mycol. Applic.* 6 : 161, 1952.
- Vanbreuseghem, R., Moriamé, G.: A propos d'un cas de teigne mixte par *Sabouraudites Microsporum fellineus* et *Trichophyton crateriforme*. *Arch. Begles Dermat. Syph.* 4 : 367, 1948 (Acc. to Langeron and Vanbreuseghem 1952).

- Vilanova, X., Casanovas, M.: Double Mycotic Infection in Some Cases of Tinea of the Scalp. *Dermatologica* 108 : 109, 1954.
- К а ш к и н, П. Н.: Дерматомикозы. Москва-Ленинград 1954.
- К а ш к и н, П. Н.: Изменчивость дерматофитов и перспективы его дальнейшего изучения. Вестник венерол. и дерматол. No. 3, 8, 1949.
- С и г а л о в а, Е. Е.: К вопросу об изменчивости дерматофитов. Вестник венерол. и дерматол. No. 5, 12, 1951.

Необычные формы изменчивости *Trichophyton mentagrophytes*

М. ГЕЙТМАНЕК и Н. ГЕЙТМАНКОВА-УГРОВА

Резюме

В результате длительной культивации без пересева из воздушной, пушистой колонии одного штамма (А) *Trichophyton mentagrophytes* Emmons 1934 (синоним: *Epidermophyton Kaufmann-Wolf*, Ариевич и Степанищева 1951) выросли коремии. На этих колониях за 2 месяца до развития коремий изучалось влияние дегидрохлорамфеникола. Их развитие мы считаем особой формой конвергентной адаптации к неблагоприятным условиям среды (1955).

Путем перевивок различных частей колоний, выросших из спор, изолированных из коремий (В), мы получили ряд субкультур (рис. 2). При их длительной культивации на среде Сабуро с глюкозой при 25 °С мы проследили развитие каждой из них в течение 8 месяцев (1956 а).

После персева и дальнейших пассажей (С₁₋₂—G₁₋₇) из спор коремий возникли субстратовые колонии, разрастающиеся непосредственно над и под поверхностью субстрата. При старении (спорообразовании) их поверхность становилась белой и мелкомухливой, и наконец на ней вырастали холмики белого, короткого, пушистого мицелия диаметром в 1—3 мм. Из них развивались коремии. Если холмики перевивались, коремии из них вырастали или прямо, или сначала появлялись субстратовые колонии, потом мухливые, новые холмики, а только потом коремии. Микроскопически для исходной пушистой формы (А) были характерны алеурии, для коремий — артроспоры, а для мухливой формы и холмиков — хламидоспоры. В субкультурах ряда J и следующих вышеописанный цикл развития протекал сокращенно: во многих случаях после персева вырастал короткий, пушистый, белый мицелий, а прямо из него — кустики коремий.

Все формы колоний развивались без преднамеренного воздействия извне. Подобным «самопроизвольным» образом после ряда пассажей развились фавиформные колонии (обозначенные G₄, 1956 б). Они выросли из части каймы белого мухливого мицелия субкультуры F₄. Макро- и микроскопические признаки этих фавиформных колоний G₄ соответствуют признакам *Trichophyton (Achorion) schönleini*: восковидное состояние, церебриформная поверхность «фавические канделябры», гребешковые образования и т. п. После 10 пассажей мы наблюдали, что они сохраняли восковидное состояние только в течение первых 14 дней культивации, а потом их поверхность становилась белой, мухливой и даже превращалась в короткий, пушистый, белый мицелий. Скорость их линейного роста была на 80% ниже, чем скорость роста исходного воздушного пушистого штамма (А). Оптимум роста наблюдался на среде с 10% глюкозы. На среде с более высоким содержанием глюкозы колонии G₄ росли и в виде короткого, пушистого мицелия желтосерого цвета. Мы находили в нем множество хламидоспор диаметром до 35μ. В одном случае из фавиформных колоний G₄

росших на среде с 10% глюкозы, развились снова коремии. Колонии G₄ не были патогенными для мышей. У 2 из 10 подопытных морских свинок результат инфекции колонией G₄ оказался неоднозначно положительным.

Настоящая работа подтверждает предположение относительно существования эволюционных отношений между колониями различных „видов“ дерматофитов (Paldrok 1953). Так встает вопрос реального существования и критериев определения вида в медицинской микологии. Его можно решить путем изучения естественной и экспериментальной изменчивости дерматофитов. Итак, все проявления изменчивости можно, по нашему мнению, рассматривать вообще как результат преодоления противоречия между специфическими требованиями грибка, зафиксированными в результате приспособления в их предшествовавших «поколениях», — и комплексом новых условий их неспецифической среды в настоящем. До сих пор не известны ни объективные и общепризнанные критерии распознавания видов кожных грибков, ни вариационный размах их форм. Поэтому превращение воздушных, пушистых колоний *Trich. mentagrophytes* (A) в фавиформные колонии типа *Trich. (Achorion) schönleini* нельзя считать переходом одного вида грибка в другой.

(Табл. XV, XVI).

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 3

Изучение заживления раны в денервированной конечности

И. ХУТНАЯ

Биологический институт ЧСАН, экспериментальная биология и генетика, Прага

Поступило в редакцию 17 II 1956

Заживление раны в денервированной области является предметом экспериментальных исследований по вопросам влияния нервной системы на процессы регенерации. Раньше некоторые исследователи (цит. Протопопов 1950) утверждали, что в денервированной области заживление раны ускоряется. Гуревич изучал заживление раны после пересечения *n. ischiadicus* у мышей и установил, что в этом случае заживление замедлялось. Задержку заживления раны в денервированной области на ухе кролика описывает также Прживойт (1952). Этот автор производил десимпатизацию исследуемой области и одновременно пересекал *n. auricularis magnus* и убедился, что денервированная ткань отличается повышенной чувствительностью по отношению к химическим стимуляторам. Регенерацию тканей и органов в условиях нарушенной иннервации у амфибий изучала также Горелова (1954). По данным этой исследовательницы, регенерация кожи в денервированной области затягивается, а регенерация органов, — в данном случае хвоста у аксолотля, — вообще не наблюдается.

Наш вклад в дело решения этого вопроса — это изучение заживления раны на конечности крысы после пересечения *n. ischiadicus* и устранения *truncus sympathicus abdominalis*. Процесс заживления исследовался макроскопически и микроскопически, на зафиксированных препаратах. При этом мы сосредоточили свое внимание на изучение воспалительной реакции в ранние периоды заживления, а также исследовали алкалическую фосфатазу, гиалуроновую кислоту и гликоген. У контрольных животных мы кроме того отмечали начало восстановления нервных волокон. Мы проследили также заживление ран, нанесенных через различные промежутки времени после денервации.

Материал и методы

Мы пользовались для опытов 6-месячными белыми крысами. Все опытные животные получали диету Ларсена. У крыс в состоянии эфирного наркоза мы пересекали *n. ischiadicus* (всегда с правой стороны) и удаляли *truncus sympathicus abdominalis*. Раны одинаковых размеров (0,7 см в диаметре) мы вырезали ножницами на *dorsum pedis* денервированной конечности. У контрольных животных мы производили лапаротомию. Опытные животные были разделены на несколько серий: I — контрольная, II — раны наносились через 3 дня после денервации, III — через неделю, IV — через 2 недели, V — через 3 недели и VI — через 4 недели после денервации. Серии I, II, V и VI были разделены на группы А и В. Группа А предназначалась для текущих наблюдений заживления раны, а группа В — для гистологии. У этой группы животных раны с лоскутом окружающей кожи вынимались под эфирным наркозом, фиксировались 10% нейтр. формолом и заливались в парафин. Для гистохимической реакции на алкалическую фосфатазу кожа фиксировалась в ацетоне. Срезы для импрегнации делались с помощью замораживающего микротомы после двухнедельной фиксации в 20% нейтр. формоле. Парафиновые срезы окрашивались гематоксилин-эозином или гематоксилином и по van Gieson-у. Далее мы с помощью толудинового синего производили реакцию на мета-

хромазию для определения в тканях кислых полисахаридов (DeLong 1953), реакцию на гиалуроновую кислоту, основанную на принципе метода Halle, с докраской пикрофуксином и кармином (DeLong 1953) и контроль к ней с помощью неполного разложения гиалуронидазой, а также реакцию на щелоческую фосфатазу. Для исследования гликогена мы пользовались окраской по Hotkiss-McManus-у и контрольной слюнной пробой. Для сравнения цитологического состава и интенсивности клеточной инфильтрации мы приготавливали дифференциальные картины определенного количества клеток (200).

Результаты

Серия I A (контрольная — 15 крыс). После того, как вырезалась рана, наблюдалось незначительное и быстро прекращающееся кровоизлияние. В течение 2 часов образовался кровяной сгусток, окружающие ткани оставались без перемен. Раны не перевязывались. На поверхности ран в течение всего периода заживления наблюдался коричневокрасный струп, который постепенно уменьшался и на 10—11-ый день отпадал. На его месте оставался светлорозовый восстановленный эпителий.

Гистологическое изучение ран у этой группы животных показывало, что заживление протекало нормально. На 10—11-ый день место ранения затягивалось восстановившейся надкожицей, под которой находилась соединительная ткань с множеством сосудов и клеток.

Гистохимическое изучение щелоческой фосфатазы в течение заживления раны указывало на весьма интенсивную реакцию в грануляционной ткани, в которой мы при окраске толуидиновым синим находили тучные клетки со значительной метахроматической грануляцией. Окружение фибробластов окрашивалось также метахроматически, — в виде широкой каймы с расплывчатыми очертаниями, идущей вдоль контуров тела этих клеток и их отростков. Метахроматически окрашивались также образования в виде расплывчатых, неправильных линий между коллагенными фибриллами, становившиеся особенно заметными при созревании грануляционной ткани. В соответствии с этим мы наблюдали здесь также положительную реакцию на гиалуроновую кислоту, которую мы определяли путем сравнения с препаратами, полуразрушенными гиалуронидазой. Положительную реакцию на гиалуроновую кислоту мы наблюдали также в грануляционной ткани, — в особенности при ее созревании в соединительную ткань, — а также в окружающей коже, в стенках сосудов, в соединительной ткани, покрывающей нервные пучки, поперечные разрезы которых в результате этой окраски становились очень хорошо заметными, и в пространствах между коллагенными пучками. Очень интенсивную реакцию на гиалуроновую кислоту дает также рыхлая соединительная ткань. В восстановленном высоком эпителии мы наблюдали сильную позитивную реакцию на гликоген; на контрольных срезах при слюнной пробе эта реакция оказывалась негативной. Положительную реакцию на гликоген дает также большая часть полибластов, а также некоторые фибробласты, точнее — их протоплазма. Появление нервных головок мы на импрегнированных срезах наблюдали на 8—11-ый день.

Серия II A (через 3 дня после денервации — 30 крыс). Рана на денервированной конечности кровоточила сильнее и дольше, чем в контроле. Струп, образовавшийся на ее поверхности, был массивнее; наблюдался небольшой экссудат. При сравнении площадей еще не заживших ран, которое производилось путем зарисовки контуров раны на целлофан, мы наблюдали у денервированных крыс запаздывание в сравнении с контролем на 20—50% времени, необходимого для заживления. У 7 из 30 крыс этой группы раны зажили на 12-ый день, у остальных 23 — на 13—17-ый день после нанесения раны.

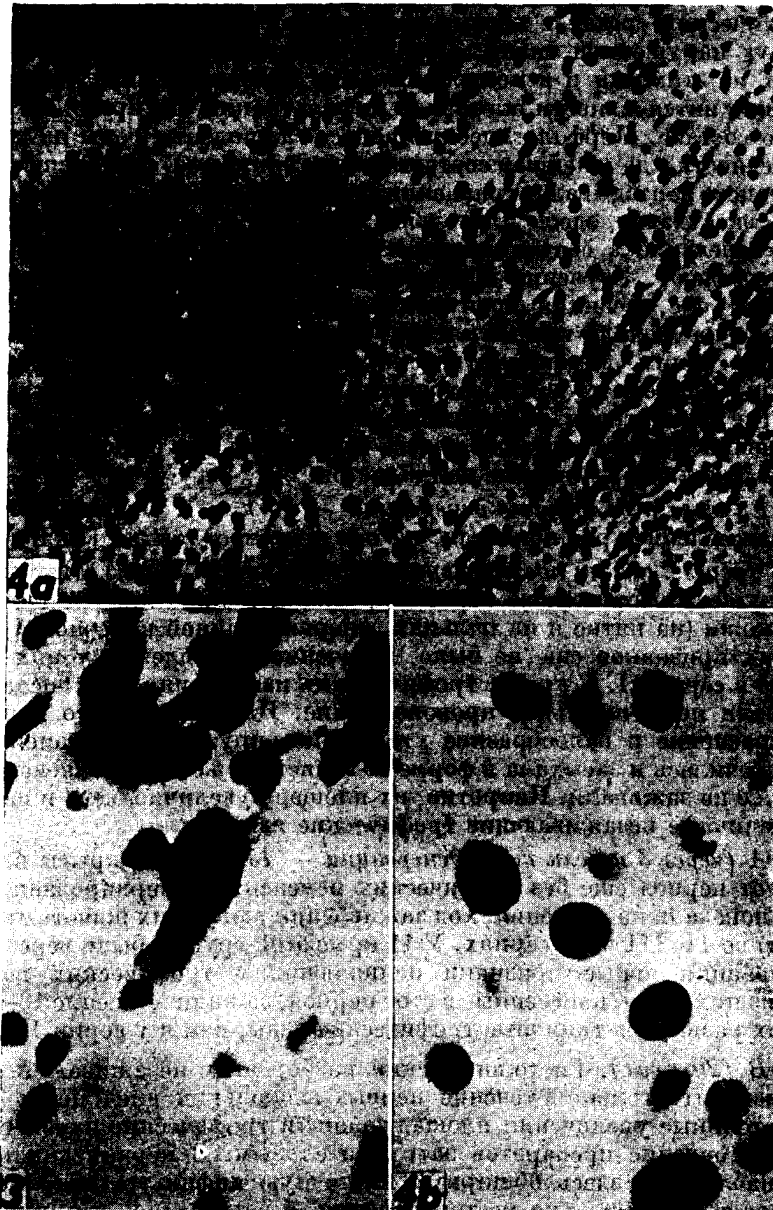


Рис. 3. Парафиновый срез. Увеличение в 1000 раз. Окраска гематоксилин-эозином. Плазматическая клетка в незаживающей вследствие денервации ране у крысы.

Рис. 4а. Парафиновый срез. Увеличение в 500 раз. Окраска гематоксилином и по van Gieson-у. «Круглоклеточная» инфильтрация при незаживающей язве человека.

Рис. 4б. Деталь предыдущего препарата. Увеличение в 1000 раз. Плазматические клетки.

Серия II B (60 крыс). Так же, как и в контрольной группе, мы наблюдали на гистологических срезах в первые часы после ранения образование инфильтрата вокруг нарушенной ткани. При сравнении дифференциальных картин, полученных из этих ран и в контроле, мы не находили между ними разницы ни при оценке интенсивности клеточной инфильтрации, ни при оценке ее цитологического состава. Морфологически процесс заживления раны на денервированной конечности в дальнейшем соответствовал контролю, с той лишь разницей, что весь процесс запаздывал в сравнении с контролем: воспалительная реакция с сильным экссудатом здесь длительнее, так что развитие грануляционной ткани, ее созревание в соединительную ткань и начало восстановления эпидермы запаздывают. Изучение алкалической фосфатазы показало, что здесь, как и в контроле, реакция грануляционной ткани бывает положительной. Здесь мы тоже наблюдали тучные клетки, окрашивающиеся очень выразительно толуидиновым синим. Метахроматически окрашивалась кайма, неправильной формы, вокруг фибробластов и пространство между фибриллами. Мы наблюдали всюду там, где и в контроле, положительную реакцию на гиалуроновую кислоту. Восстановившийся эпителий давал и здесь положительную реакцию на гликоген, который мы находили и в плазме полибластов.

Серия III (через неделю после денервации — 10 крыс). Непрерывные наблюдения над заживлением ран показали, что оно протекает так же, как и в серии II.

Серия IV (через 2 недели после денервации — 10 крыс). У 8 из этих 10 крыс мы наблюдали уже в этот период первые признаки начинающихся трофических изменений кожи (на пятке и на пальцах денервированной конечности). У 2 последних этих признаков еще не было, и течение заживления у них отвечало заживлению в серии II. У крыс с трофическими изменениями мы после вырезки раны отмечали незначительное кровоизлияние. Начиная со 2-го дня, наблюдалось покраснение и валообразное утолщение окружающих тканей: поверхность раны сочилась и засыхала в форме объемистого желтокоричневого струпа. Эти раны уже не заживали. Напротив, их площадь увеличивалась и из них развивались типичные незаживающие трофические язвы.

Серия V A (через 3 недели после денервации — 15 крыс). 4 крысы из 15 оставались в этот период еще без трофических изменений денервированной конечности. Как показали наблюдения, ход заживления ран у этих животных отвечает заживлению во II, III и IV сериях. У 11 крыс этой группы были через 3 недели после денервации явные признаки начинающихся трофических изменений, однако у 2 из них раны, нанесенные в этот период, зажили в течение 13—15 дней. У остальных развились типичные трофические язвы, как и у серии IV.

Серия V B (20 крыс). Гистологический разбор этих незаживающих язв мы могли производить только в течение первых нескольких дней после ранения, так как постоянные увеличения площади раны и трофические изменения кожи делали приготовление препаратов затруднительным. В первые дни после ранения мы наблюдали здесь обширную клеточную инфильтрацию, которая не ограничивалась одним только местом ранения, а встречалась и в окружающей коже под эпидермой. Отдельные лейкоциты находились также среди дегенерирующих клеток эпидермы. На дне раны и в окружающих тканях, кроме лейкоцитов, со второго же дня после ранения бросается в глаза т. н. «круглоклеточная» инфильтрация. В содержимом раны, — которое в этот период состоит из кровяного сгустка, организующегося в струп, фибрина и лейкоцитов в самых разнообразных стадиях дегенерации и распада, — можно наблюдать гигантские полибласты с заглотанными эритроцитами, деформирующими их ядра, как было нами описано (Хутная 1953). Среди клеток на дне раны встречается много лимфо-

цитов, полибластов, а также плазматические клетки и фибробласты. У полибластов часто наблюдается amitotическое деление, а кроме того некоторые формы деления, которые описывают как почкование ядра и фрагментацию. В плазме полибластов бывают вакуоли, заглотанные эритроциты и остатки заглотанных лейкоцитов. Мы не производили подсчета фагоцитирующих клеток в этих ранах и в контроле, но все же можем сказать, что для того количества дегенерированных и распадающихся клеток, какое находится в этих ранах, фагоцитоз всего этого материала не слишком интенсивен. Случаев митоза фибробластов мы в некоторых наших препаратах этих ран не встречали. В то время как в контроле дно раны образует рыхлая соединительная ткань с тонкими фибриллами и множеством активизовавшихся свободных клеток, без более толстых коллагенных волокон, — на дне этих ран наблюдается плотная ткань, в которой проходит множество коллагенных волокон, соединяющихся местами в толстые пучки. Кожа вокруг раны под эпидермой пронизана лейкоцитами, которые находятся также между клетками эпителия. В дерме ясно видна отечность. Бросаются в глаза изменения сосудов: просвет некоторых артерий бывает резко сужен, — вплоть до облитерации; распухший эндотелий выпячивается глубоко в просвет сосуда. В мышцах стенок сосудов находятся многочисленные коллагенные волокна. В некоторых венах мы находили тромбы. В период, когда в контроле наблюдается уже значительное развитие грануляционной ткани, здесь можно видеть затянувшуюся воспалительную реакцию со значительным экссудатом, толстый слой лейкоцитов на поверхности раны и увеличение площади раны в результате отступления дегенерированной эпидермы и дермы. При окраске толуидиновым синим мы находили здесь также тучные клетки. Реакция на гиалуроновую кислоту бывала также положительной вокруг фибробластов и на дне раны, между коллагенными фибриллами, однако окрашиваемость в сравнении с контрольными препаратами бывала гораздо слабее.

Серия VI A (через 4 недели после денервации — 10 крыс). У 8 животных из 10 наблюдались трофические изменения денервированной конечности. Течение заживления у 2 крыс без трофических изменений запаздывало на 5 дней в сравнении с контролем. У остальных 8 крыс картина развития язвы была такая же, как было описано у серии V A.

Серия VI B (10 крыс). Гистологическая картина у этой группы соответствовала картине, описанной у серии V B.

Дискуссия и резюме

При своих опытах мы наблюдали на денервированных конечностях крыс запаздывание заживления ран на 20—50% времени, необходимого для заживления, — если раны наносились через короткие сроки после денервации (через 3—7 дней). Если же раны наносились уже в период развития трофических изменений денервированной конечности, то из них развивались трофические язвы. Наши исследования были направлены на микроскопическое изучение этих в одном случае заживающих при неблагоприятных условиях, а в другом случае — совсем не заживающих ран. У ран, заживление которых затягивалось, мы наблюдали удлинение регрессивной фазы и запаздывание развития грануляционной ткани и эпителизации. Изучение алкалической фосфатазы, гиалуроновой кислоты и гликогена показало, что здесь нет сколько-нибудь заметной разницы в сравнении с контролем. Что касается изучения алкалической фосфатазы в контрольных ранах, наши данные отвечают данным Fell-a (1943) и Gould и Gould (1951). French (1954) замечает, что при заживлении ран алкалическая

фосфатаза не подвергается первичному накоплению в грануляционной и соединительной ткани, а находится в тесной связи с регенерирующим эпителием. В этой же работе он описывает повышение количества гликогена в восстановленном эпителии, что отвечает и работам Яковлевой (1953) и Lobitz-a (1954), а также нашим наблюдениям. Яковлева так же, как и мы, наблюдала гликоген и в макрофагах. В современной литературе посвящается много внимания гистохимическому изучению мукополисахаридов. Мукополисахариды, в нормальных условиях переходящие в полимеризованное состояние, — с толуидиновым синим реагируют метахроматически. Напротив, Follis (1951) доказывает, что метахроматическая окраска не является специфической гистохимической пробой для выявления мукополисахаридов, так как — и при наличии большого количества мукополисахаридов в коже — свежая, незафиксированная кожа никогда не бывает метахроматической, тогда как свежие, незафиксированные сухожилия, хрящи и пуповина дают метахромию. Gersch и Catchpole (1949) утверждают, что мукополисахариды выделяются фибробластами, что соответствует нашим наблюдениям положительной реакции вокруг этих клеток. В культурах фибробластов тоже в последнее время было отмечено, что эти клетки выделяют вещества характера мукополисахаридов (Grossfeld 1955). Bradfield и Kodicek (1951) нашли большое количество мукополисахаридов при изучении заживления ран у цыготных морских свинок. Staemmler и Sylven (цит. по Mathó 1954) пишут, что метахроматическое вещество выделяется тучными клетками. Исходя из факта, что зернистость тучных клеток не разлагается гиалуронидазой, Asboe-Hansen (цит. по Mathó 1954) полагает, что эти клетки выделяют предшественников гиалуроновой кислоты. Hedbome (1955), который производил анализы изолированной цитоплазматической зернистости тучных клеток, установил, что микроскопически видимая зернистость не имеет антикоагуляционного действия, т. е. не содержит гепарина. С другой стороны его работа показывает, что эта зернистость имеет отношение к гистамину. По нашим наблюдениям, тучные клетки всегда присутствуют в грануляционной ткани, а в первые дни особенно бросаются в глаза на дне раны. Что касается начала регенерации нервных волокон при заживлении раны, мы наблюдали восстановление этих волокон на 8—11-ый день. Венгерские авторы (Dévényi и Holzinger 1954) описывают появление нервов уже на 5-ый день после ранения. Что же касается трофических язв, описанная нами картина соответствует морфологическим данным о незаживающих ранах у человека. Маловыразительная реакция на гиалуроновую кислоту в незаживающих ранах при наших опытах отвечает общей морфологической картине. Протопопов (1950) описывает дегенеративные атрофические изменения кровеносных сосудов при незаживающих ранах: изменения проницаемости капилляров, сопровождающиеся частыми гемorragиями в грануляционной ткани, утолщения эндотелия и фибриноидное перерождение стенок артерий, тромбы в венах и тромбофлебиты, дистрофические изменения эпителия. Хлопина (1953) очень подробно изучала изменения кровеносных сосудов после пересечения n. ischiadicus. Она наблюдала облитерацию просветов сосудов, замещение мышечных волокон коллагеном, отверстия в эластических оболочках. В наших препаратах мы тоже находили изменения этого характера. Изменения в сосудах свидетельствуют об очень плохом состоянии кровоснабжения, а большое количество лейкоцитов показывает, что воспалительная реакция в этих ранах протекает необыкновенно интенсивно. Наблюдавшийся нами здесь т. н. «круглоклеточный» инфильтрат является характерным признаком хронических воспалительных процессов. Наши цитологические исследования показали, что клетки этого инфильтрата подвергаются дегенерации. Часто здесь встречаются плазматические клетки. Этому соответствуют и наши

наблюдения плазматических клеток в оттисковых препаратах и в парафиновых срезах из незаживающих ран человека. Наблюдавшееся нами здесь ослабление фагоцитоза свидетельствует об ареактивности ткани и тоже соответствует нашим данным относительно незаживающих ран у человека (Хутная 1954). Характерными признаками далее являются здесь отсутствие митотического деления, атипичные формы амитоза и частые случаи многоядерности клеток. По нашим наблюдениям, значительно изменяется функция фибробластов, о чем свидетельствует уменьшение количества митозов у этих клеток и слабость или полное отсутствие реакции на гиалуроновую кислоту около них. Мы имели возможность произвести гистологические исследования нескольких незаживающих ран человека. При этом мы наблюдали на дне их склеротически видоизмененную ткань. По Mathó (1954), одной из причин склеротических процессов является длительная отежная ингибция межклеточного вещества. Как показывали наши препараты, отежное пропитывание тканей при незаживающих ранах бывало весьма значительным. Итак, нарушение трофики тканей, вызывающее развитие вышеописанной морфологической картины, способствует возникновению незаживающих ран из сравнительно небольших дефектов, несмотря на то, что общая реакция организма на это ранение, выражающаяся в местной лейкоцитарной инфильтрации, бывает очень выразительной и интенсивной. Для изучения заживления ран на денервированной конечности мы пользовались очень богатым экспериментальным материалом, причем оказалось, что индивидуальные реакции крыс на подобные вмешательства бывают очень неоднородны.

Были описаны изменения в процессе заживления раны у крыс в различные сроки после денервации.

Л и т е р а т у р а

- Горелова, П.: К вопросу о регенерации тканей и органов у амфибии в условиях нарушенной иннервации. ДАН СССР 96 (2), 1954.
- Пржиבוйт, С. Ф.: О роли нервной системы в процессах регенерации ткани. Бюллетень эксп. биол. и мед. 12, 1952.
- Протопопов, С. П.: Патогенез и лечение длительно незаживающих ран. Москва 1950.
- Хлопина, С. Д.: Изменения кровеносных сосудов в денервационной ткани. ДАН СССР 92 (4), 1953.
- Хутная, И.: Изменения в инфильтрате при заживлении раны. Чсл. Биология 2 : 44, 1953.
- Хутная, И. и Оpatrная, В.: Оценка хода заживления раны по методу отпечатков. Чсл. Биология 3 : 359, 1954.
- Яковлева, В. М.: Цитохимическое исследование процесса заживления раны у белой мыши. ДАН СССР 92 (3), 1953.
- Bradfield, F., Kodicek, E.: Abnormal Mucopolysaccharides on Praecollagen in Vitamin-C Deficient Skin Wounds. Biochem. J. 49 : 1, 1951.
- Danielli, S. F., Fell, H. B., Kodicek, E.: The Enzymes of Healing Wounds. Brit. J. Exp. Path. 26 : 367, 1945.
- Delong, V.: Kyselý polysacharidy v patologických procesech. Čas. lék. čes. 92 : 877, 1953.
- Dévényi, I., Holzinger, L.: Evolution of Connective Tissue and Nerves Fibres in Healing Wounds. Acta Morphol. 4 : 54, 1954.
- Fell, H. B., Danielli, S. F.: The Enzymes of Healing Wounds. Brit. J. Exp. Path. 24 : 196, 1943.
- Follis, R. N.: Effect of Proteolytic Enzymes and Fixation on Metachromasia of Skin Collagen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76 : 2, 1951.
- French, J. E., Bendit, E. P.: Observatin on the Localisation of Alkaline Phosphatase in Healing Wounds. A. M. A. Arch. Path. 57 (1), 1954.
- Gersch, I., Catchpole, N. R.: The Organisation of Ground Substance and Basement Membrane and its Significance in Tissue Injury, Disease and Growth. Am. J. Anat. 85 : 457, 1949.

- G o u l d, E., G o u l d, A.: Studies on the Alkaline Phosphatase Associated with Regenerating Connective Tissue Fibres. A. M. A. Arch. Path. 52 : 413, 1951.
- G r o s s f e l d, H., M e y e r, K., G o d m a n n, G.: Differentiation of Fibroblasts in Tissue Culture, as Determined by Mucopolysaccharide Production. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 88 : 31, 1955.
- H e d b o m e, A.: Isolation and Analysis of the Large Cytoplasmic Granules of Tissue Mast Cells. Exp. Cell. Res. 9 : 148, 1955.
- L o b i t z, J. W., H o l y c h e, J. B.: The Histochemical Response of the Human Epidermis to Controlled Injury: Glycogen. Exc. Med. 7. Sect. V. 1954.
- M a t h ö, L.: Pathology of the Connective Tissue. Acta Morphol. 4 : 5, 1954.

A Study of Wound Healing in a Denervated Extremity

J. CHUTNÁ

Summary

A description is given of wound healing in the denervated extremity of rats, following the severing of the sciatic nerve and the removal of the abdominal trunk of the sympathetic, when the wound was inflicted from three to 21 days after denervation, in rats without trophic signs in the denervated extremity.

A cytological, histological and histochemical study was made of these wounds, in which, in addition to a prolonged regressive phase and general retardation in healing, no striking differences were found as compared with the controls.

If wounds were inflicted from 14 days to four weeks after denervation in rats which, in that period, showed progressive trophic changes in the denervated extremity, typical non-healing trophic ulcers developed from originally small wounds (0.7 cm. in diameter).

A microscopic analysis of these non-healing wounds showed a picture similar to that of clinical non-healing wounds. As characteristic signs for this type of wound, a description is given of changes in the blood vessels, tissue oedema and infiltration of the surrounding skin, massive leucocytic infiltration and "round cell" infiltration, containing lymphocytes, polyblasts with signs of degeneration and diminished phagocytic activity, multinuclear cells, conspicuous plasma cells, further a decrease in the number of mitoses in the fibroblasts, a less marked reaction to hyaluronic acid and sclerotically changed tissue in the base of the wound.

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 3

Immunological Behaviour of Embryonal Parabionts between Turkey and Hen

T. HRABA

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Experimental Biology and Genetics, Praha

Received March 19, 1956

In embryonal parabiosis between the embryos of birds (Hašek 1953a), the chorio-allantoid blood vessels are joined. A piece of embryonal tissue is placed between the exposed allantochoiria of two eggs. During vascularisation of this tissue by the blood vessels of the contiguous allantochoiria, anastomoses are formed between the extra-embryonal circulations of both embryos and a mutual exchange of blood occurs. In this way it is possible to join not only the embryos of birds of the same species, but also of birds of different species. In embryonal parabionts between hens, complete depression of the formation of agglutinins against the partner's blood cells occurs in postembryonic life (Hašek 1953b). In embryonal parabionts between duck and hen, complete depression of the immunity response was not found. (Frenzl et al. 1955, Hašek et al. 1955). The parabionts (ducks and hens) formed natural and immune agglutinins, the ducks in a lower titre, but the hens in the same titre as the controls. It was therefore shown — and the results of other authors are in agreement with this (Burnet et al. 1950, Billingham et al. 1953, Buxton 1954, Simonsen 1955) — that complete depression of the immunity response occurs only if cells of a phylogenetically related bird act on the embryo. In the case of birds which are phylogenetically remote, there is at most a decrease in the immunity reaction under the same conditions. In the present work we are dealing with the immunological reactivity of embryonal parabionts between turkey and hen against the erythrocytes and also against the serum proteins of the partner's species. The main aim of the work is to ascertain whether it would be possible to evoke complete depression of antibody formation by the action of the cells of a phylogenetically related species. As in the case of the parabionts between duck and hen (Hašek et al. 1955), the formation of a vascular connection between the two partners was ascertained by the serological demonstration of foreign erythrocytes in the circulating blood of the parabiont. Only birds in which an exchange of blood had been demonstrated were selected for the experiments. In addition, this method was used to observe how long the foreign erythrocytes survived in the circulating blood of the parabiont.

Methods

For the reactions, citrated plasma which had been kept at -10°C or $+4^{\circ}\text{C}$ was used. The agglutination reaction was carried out by the test-tube method, by adding one drop of a 2.5–5% suspension of erythrocytes to two drops of plasma. Readings were taken after 15 minutes and 1–2 hours. The titre is given according to the highest dilution at which agglutination could be seen by the naked eye after 15 minutes.

The precipitins were demonstrated by a ring reaction, which was read off after 15 to 20 minutes. The antigen for determining the titre was diluted only in tenths. A reaction was not established between

the undiluted antiserum and the undiluted antigen, because of difficulties in layering. A negative reaction in the tables, therefore, means that plasma does not react by precipitation with the antigen diluted in the proportion of 1 : 10.

Turkey serum proteins were ascertained in the plasma of hens by means of the immune plasma of chick No. 6/337, diluted in the proportion of 1 : 10.

The exchange of blood cells in the parabionts was demonstrated by the method described in a previous communication (Hašek et al. 1955).

Results

In six hen parabionts with turkeys it was found that in most cases the turkey blood cells disappeared from the circulating blood of hens in the third week after hatching. In one chick, however (No. 6/307), they survived until the eighth week, i.e. until immunisation. On collecting the blood on the seventh day after immunisation they were no longer present, although this chick did not form agglutinins. The immunological method used by us was effective in demonstrating turkey blood cells mixed with hen cells only if the former constituted more than 5% of the total number of elements. After hatching, the weight of chick No. 6/307 increased by the eighth week from 41 g. to 585 g. The weight of the turkey partner on hatching was 56 g., so that the amount of turkey blood cells in the common circulation of both partners was probably about 58% (in proportion to their respective weight). If no breaking-down of the turkey erythrocytes had occurred, therefore, in the blood of this parabiont during post-foetal life, their amount would have been just on the borders of demonstrability. Taking into account, however, the fact that during this relatively long period destruction must no doubt have been considerable, it must be concluded that new turkey blood cells must have been released into the blood stream during post-embryogenesis. These blood cells could only have been formed in turkey haemopoietic tissue, which was transferred to the hen parabiont during embryonal parabiosis. The only possible explanation of this late finding of turkey blood cells in our parabiont, therefore, is that it is an inter-specific blood chimera.

In four turkey parabionts with hens, hen erythrocytes were demonstrated in the circulating blood on the fifth or seventh day after hatching. They were no longer found in specimens of the blood of these parabionts taken on the 14th or 17th day after hatching. In another two parabionts, in which an exchange of blood had been demonstrated after hatching, a further examination was made at the age of one month, but hen blood cells were not found in the blood of these parabionts either.

2. The first immunisation of hen embryonal parabionts with turkeys was carried out at the age of eight weeks with one dose of 0.5 ml. of whole citrated blood. Since the partners of two of the parabionts were no longer alive, the blood of control turkey No. 55 was used for immunisation. Immune plasma was collected on the seventh day after hatching. Before immunisation, the titre of natural agglutinins against the donor blood cells in the controls was at least 1 : 2. Natural agglutinins were not found in any of the four parabionts. After immunisation, agglutinins were found in the controls in titres of at least 1 : 16. Of the parabionts, only one formed agglutinins, in the titre of 1 : 4. The remaining three parabionts did not form agglutinins against the erythrocytes of turkey No. 55. Although parabiont No. 640 had no agglutinins against the donor, agglutinins were present against the blood cells of its partner from embryonal parabiosis, after immunisation. Chick No. 6/307, the second parabiont whose partner was still alive, did not form agglutinins either against turkey No. 55 or against its partner. Table 1 does not include one parabiont which was immunised at the age of six weeks with two doses of blood of its partner. In this bird, natural agglutinins were present before immunisation, which also reacted with the blood cells of the partner. After immunisation it formed agglutinins in the same titre as the control (1 : 32 in both birds).

Table 1. Titres of Agglutinins and Precipitins against Turkey Blood in Hen Parabionts with Turkeys on Immunisation at Age of Eight Weeks

Hen No.	Titre of Aggl.		Precipit.	Turkey Eryth.		Tur. Ser. Prot.	
	Natural	Immune		Before	After	Before	After
Parabiont:							
6/307	0	0	0	+	—	+	+
633	0	4	100	—	—	—	—
635	0	0	10	—	—	±	—
640	0	0	100	—	—	—	—
Controls:							
6/332	8	32	1000				
6/333	8	32	1000				
6/337	2	16	1000				
6/338	16	16	100				
6/340	2	32	1000				
638	2	16	1000				

Table 2. Titre of Agglutinins and Precipitins against Turkey Blood in Hen Parabionts with Turkeys after Re-immunisation at Age of Six Months

No. of bird	Titre of Agglutinins		Titre of Precipitins
	Before	After	
Parabionts:			
6/307	0	16	0
633	2	16	1000
635	0	4	100
640	1	32	10000
Controls:			
6/332	4	32	10000
6/333	1	64	10000
6/338	2	32	1000
638*	2	2	1000

* Immunisation dose injected outside vein.

Precipitins against turkey plasma were formed by all the controls and by three parabionts. Only chick No. 6/307, in whose plasma turkey serum proteins had been found before immunisation, did not form precipitins against them. Turkey proteins were still demonstrated in its plasma a week after immunisation. Chick No. 635, in which it had not been possible to ascertain reliably whether turkey proteins were present in its serum before immunisation, formed precipitins. The titres of the precipitins in the three parabionts which formed them were, however, lower than in the controls. Taken on the whole, the decrease in the titre of precipitins in the hen parabionts is statistically significant ($t = 3.65$, $P < 0.01$).

3. Re-immunisation was carried out in the hen parabionts with turkeys at the age of six months. Control turkey No. 55 was again used as the donor. In tab. 2,

the values on the seventh day after immunisation are given as the immune titres, as they were higher than the titres in the collection made on the fourth day. After immunisation the titre of agglutinins was higher in all the birds and the difference in the parabionts and the controls was not significant ($t = 1.69$, $P > 0.05$), even after the exclusion of control No. 638, in which the immunising dose had been injected outside the vein. If the titre in this bird is not taken into account, the titre in the three parabionts was, nevertheless, at least one dilution lower than in the controls.

Precipitins were formed by all parabionts and controls, with the exception of parabiont No. 6/307. This was the bird in which turkey erythrocytes and serum proteins were found on immunisation in the eighth week after hatching. In contrast to the turkey erythrocytes, these proteins did not disappear from the circulating blood after immunisation, but could no longer be demonstrated in a specimen of plasma collected a month later. In spite of the fact that parabiont No. 6/307 formed no precipitins and parabiont No. 635 formed them in a lower titre than the controls, their decrease in the parabionts is not significant ($t = 1.72$, $P > 0.05$).

4. Immunisation of the turkeys was carried out at the age of five months with six doses of 1 ml. citrated hen blood on alternate days. Fourteen days after the last immunising dose, a provocative dose was administered (1 ml. hen blood). Parabiont No. 803 was immunised with the blood of its partner; the partners of parabionts Nos. 801 and 808 were no longer alive and they were therefore immunised with the blood of other hens. The titre of agglutinins in collections made on the fourth day after immunisation was higher than in collections made on the seventh day and the titre obtained after the immunisation series was higher than following the provocative dose. In tab. 3, therefore, the values from the fourth day after completing

Table 3. Titres of Agglutinins and Precipitins against Hen Blood in Turkey Parabionts with Hens

Donor	Recipient	Titre of Agglutinins		Titre of Precipitins
		Natural	Immune	
6/307	803 parabiont	0	0	10
	801 parabiont	0	2	100
536	802 control	0	16	0
	804 control	0	16	100
841	808 parabiont	2	4	10
	805 control	1	8	0
	809 control	0	64	10
867	25 control	0	16	10
	806 control	1	8	0
	807 control	1	4	0
	811 control	0	8	0

the immunisation series are given as the titre of immune agglutinins. The titres of precipitins were not established following the immunisation series; on the fourth and seventh day after the provocative dose they were the same and are given in the same table.

All the control turkeys formed immune agglutinins against hen erythrocytes. Parabiont No. 803 formed no agglutinins during the whole of immunisation with the blood of its partner and parabionts Nos. 801 and 808, immunised with the blood

of control hens, formed immune agglutinins in a lower titre than the controls. The difference between the group of parabionts and the controls is significant ($t = 3.27$, $P < 0.01$). Precipitins were formed by all three parabionts, but by only three controls out of eight. The ability to form precipitins is not therefore in any way decreased in the parabionts.

Discussion

Already in a previous communication (Hašek et al. 1955) an account was given of the case of a hen embryonal parabiont with a turkey, which at the age of three months did not form agglutinins after immunisation with three doses of turkey blood cells administered on alternate days. Only after the administration of a further dose, ten days after completing the first immunisation series, was a small amount of agglutinins found. In the present work, complete suppression of the formation of agglutinins against turkey erythrocytes was found in three of four hen embryonal parabionts with turkeys on immunisation at the age of eight weeks. The finding of a blood chimera in one parabiont is evidence of complete suppression of the antagonistic immunity reaction, not only against turkey blood cells, but evidently also against turkey haemopoietic tissue. This chimera, which was composed of hen and turkey erythrocytes, was maintained up to the eighth week after hatching. It is also possible that the turkey serum proteins which were found in the circulating blood of this parabiont at eight weeks, were not only passively transferred during embryonal parabiosis, but were freed into the blood stream by turkey cells maintained in the body of the hen parabiont even in post-embryogenesis. The turkey proteins found in the blood of this parabiont after immunisation, could have been the proteins which were injected as the immunisation dose, because the parabiont did not form precipitins against them. In spite, however, of the fact that the turkey proteins disappeared from the circulating blood of this parabiont, it did not form precipitins even on re-immunisation at the age of six months. The other parabionts formed precipitins, but in a lower titre than the controls. Immunological approximation was therefore found in them, not only to cellular elements but also against serum proteins.

In the case of turkey parabionts with hens, complete suppression of the formation of agglutinins against hen erythrocytes was found in one case; the other two parabionts formed agglutinins, but in a lower titre than the controls. It is impossible to decide from this small series whether the difference is due to the fact that in the one case immunisation was carried out with the blood of the partner and in the case of the two others with the blood of control hens. From earlier results it would appear, however, that in immunological approximation between different species, the decisive factor is the specific antigen and that intra-specific antigenic differences do not play an important part. In duck embryonal parabionts with hens, the decrease in the formation of agglutinins against hen erythrocytes was the same whether immunisation was carried out with the blood of the partner in parabiosis or with the blood of another hen (Hašek et al. 1955). In this work, complete suppression of the formation of agglutinins was found in hen embryonal parabionts with turkeys which were immunised with the blood of a turkey other than the partner in parabiosis.

What is more remarkable is that a decrease in the formation of precipitins against hen serum proteins was not found in turkey parabionts. Immunological approximation produced by embryonal parabiosis, however, disappears of its own accord in the post-foetal period. It is possible, therefore, that if immunisation of the turkeys had been carried out earlier, approximation against hen serum proteins would also have been found. This is borne out by the findings in hen parabionts, in which the decrease in the titre both of agglutinins and of precipitins was significant only on

immunisation at eight weeks, but not on re-immunisation at six months. Here, however, the first immunisation may play a part, since it is not excluded that the contact with the antigen against which approximation took place in embryogenesis, causes approximation to be effaced.

To the question whether complete suppression of antibody formation can be evoked if cells of a phylogenetically related species act on the embryo, it is possible to reply in the affirmative. Complete suppression of antibody formation was found by us in several hen parabionts with turkeys and also in one turkey parabiont with a hen. An interspecific blood chimera was also found in a hen parabiont with a turkey, which could only have been caused by immunological approximation.

Summary

1. In studying the survival of the blood cells of the species of the partner in the circulating blood of embryonal parabionts between turkey and hen, an interspecific blood chimera was found in one hen parabiont, which had evidently been caused by the transplantation of turkey haemopoietic tissue during parabiosis and its survival in the body of the parabiont during post-embryogenesis.

2. Following immunisation of four hen parabionts with turkeys at the age of eight weeks with a single dose of turkey blood, only one parabiont formed agglutinins. All six controls formed agglutinins. One parabiont immunised at the age of seven weeks with two doses of the blood of the partner in parabiosis formed agglutinins in the same titre as the control.

Precipitins were formed against turkey blood proteins by all the controls in this immunisation and by three of the four parabionts. The titre in the parabionts was lower than in the controls.

3. On the re-immunisation of the hen parabionts with turkeys, at the age of six months, the decrease in the formation of agglutinins against turkey blood cells and of precipitins against turkey serum proteins was not significant when compared with the values in the controls.

4. Turkey embryonal parabionts with hens formed agglutinins against hen blood cells, after immunisation with hen blood, in a significantly lower titre than the controls (one parabiont formed none at all). The formation of precipitins against hen serum proteins was not decreased in the parabionts.

Literature

- Billingham, R. E., Brent, L., Medawar, P. B.: Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. *Nature* 172 : 603, 1953.
- Burnet, F. M., Stone, J. D., Edney, M.: The Failure of Antibody Production in the Chick Embryo. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 28 : 291, 1950.
- Buxton, A.: Antibody Production in Avian Embryos and Young Chicks. *J. Gen. Microbiol.* 10 : 398, 1954.
- Frenzl, B., Hašek, M., Hašková, V., Hřaba, T.: Imunologické vztahy u embryonálních parabiontů mezi kachnou a slepicí. I. *Čs. biologie* 4 : 1, 1955.
- Hašek, M.: Vegetativní hybridisace živočichů spojením krevních oběhů v embryonálním vývoji. *Čs. biologie* 2 : 265, 1953 (a). Гашек, М.: Вегетативная гибридизация животных путем соединения кровообращения в течение эмбрионального развития. *Чсл. Биология* 2 : 267, 1953a.
- Hašek, M.: Parabiosa ptáků v embryonálním vývoji. *Čs. biologie* 2 : 25, 1953 (b). Гашек, М.: Парабиоз птиц во время эмбрионального развития. *Чсл. Биология* 2 : 29, 1953 б.
- Hašek, M., Hřaba, T., Benešová, H., Hlaváčková, H.: Imunologické vztahy u embryonálních parabiontů mezi kachnou a slepicí. II. *Čs. biologie* 4 : 135, 1955.
- Simonsen, M.: Artificial Production of Immunological Tolerance. *Nature* 175 : 763, 1955.

Иммунологическое поведение эмбриональных парабионтов
между индюшкой и курицей

Т. ГРАБА

Резюме

Эмбриональный парабиоз между зародышами птиц мы создаем, вкладывая между обнаженными аллантиохорионами двух яиц кусочек эмбриональной ткани. В течение васкуляризации этой ткани образуются анастомозы между аллантиохориальным кровообращением обоих зародышей (Гашек 1953а). У эмбриональных парабионтов-кур в постэмбриогенезе наблюдается полное угнетение способности к образованию агглютининов против кровяных телец партнера (Гашек 1953б). Однако эмбриональные парабионты между курицей и уткой сохраняют способность образовать естественные и иммунные агглютинины против кровяных телец вида партнера. Утки-парабионты образуют их в более низком титре, чем в контроле, но у кур не наблюдалось разницы в титрах у парабионтов и контрольных особей (Френцль 1955, Гашек и др. 1955). Задачей настоящей работы было установить, может ли способность к образованию агглютининов против эритроцитов эмбрионального парабионта полностью подавляться и в том случае, если партнер принадлежит не к тому же, но к филогенетически близкому виду.

Мы создавали условия эмбрионального парабиоза между индюшкой и курицей. Успешность парабиотического соединения мы проверяли путем доказательства наличия эритроцитов партнера в крови парабионта с помощью реакции агглютинации. При этом у одной курицы-парабионта мы еще на 8-ой неделе после выклевывания нашли в крови эритроциты индюшки. Это явление можно объяснить только как межвидовую химеру после трансплантации курице кровеносной ткани индюшки в течение парабиоза. Эта ткань потом и в течение постэмбриогенеза выделяла в кровяное русло новые элементы крови индюшки.

При иммунизации кур-парабионтов в возрасте 8 недель одноразовой дозой цельной крови индюшки у большинства парабионтов агглютинины против эритроцитов индюшки не образовались (в контроле они образовались у всех). Преципитины против индюшечьих сывороточных белков парабионты образовали в титре, статистически значимо более низком, чем в контроле. При реиммунизации в возрасте 6 месяцев статистически значимой разницы в титрах агглютининов и преципитинов между парабионтами и контролем не наблюдалось.

При иммунизации индюшек-эмбриональных парабионтов с курицей в возрасте 5 месяцев куриной кровью парабионты вырабатывали агглютинины против куриных эритроцитов в титре, который был статистически значимо ниже, чем в контроле (а у 1 парабионта агглютинины не образовались вовсе). Способность к образованию преципитинов против куриных сывороточных белков у парабионтов снижена не была.

Итак, нам удалось найти, по крайней мере у некоторых парабионтов между индюшкой и курицей, случаи полного подавления способности к образованию агглютининов против эритроцитов вида партнера. Кроме того у кур-парабионтов мы наблюдали снижение (а у 1 курицы — полное подавление) способности к образованию антител против неклоточного антигена — сывороточных белков индюшки.

FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 3

Zur Frage der quantitativen koprologischen Untersuchungsmethoden in der Helminthologie

B. ERHARDOVÁ und B. RYŠAVÝ

Biologisches Institut der Tschsl. Akademie der Wissenschaften, Parasitologie, Praha

Eingelangt am 18. 4. 1956

Die koprologischen Untersuchungsmethoden in der Helminthologie gehören noch immer zu den schnellsten und verlässlichsten diagnostischen Hilfsmitteln zur Feststellung des Befalles von Menschen und Tieren durch parasitische Würmer. Sie bewähren sich besonders in der Veterinärmedizin und werden daher fortlaufend ausgearbeitet und präzisiert, sodass die Zahl dieser Methoden und ihrer Modifikationen bereits beträchtlich angewachsen ist. Die qualitativen koprologischen Methoden der Diagnostik finden in der praktischen Helminthologie besonders wegen ihrer verhältnismässigen Einfachheit häufige Anwendung, die eine massenweise Untersuchung von Menschen und Tieren ermöglicht.

Die zweite Gruppe der koprologischen Untersuchungsmethoden, die *quantitativen* ovoskopischen oder larvoskopischen Methoden, verdienen aber eine eingehendere Würdigung schon deshalb, weil auf ihren Ergebnissen eine Reihe von Arbeiten beruht, die hauptsächlich für die Pharmakologie (Feststellung der Heilmittelwirkung), Epizootologie (Dynamik des Helminthosenverlaufs, Saisondynamik) usw. von Bedeutung sind.

Zu den heute allgemein und am geläufigsten angewandten Methoden gehören die Methoden von Willys, Stoll, Vajda, Brumpt, Caldwell, Wetzel und anderen Autoren. Bei uns wurde die quantitative koprologische Methode von Hovorka (1949) ausgearbeitet, der die hämatologische Zählkammer mit einem Spezialraster verwendet. Mit allen diesen Methoden wird zwar die Zahl der Helmintheneier in der Gewichtsmenge der Fäkalien des untersuchten Individuums verhältnismässig genau festgestellt, doch gilt dieser Wert nur für einen bestimmten, zeitlich sehr begrenzten Abschnitt. Die Zahl der Eier oder Larven sinkt oder steigt bereits im Verlaufe einiger Stunden sehr stark. Da sich in jedem Falle diese Zahl täglich mehrmals ändert, wird also mit den quantitativen Methoden die Menge der Helmintheneier nur in einem gegebenen Zeitabschnitt und nur für einen bestimmten Teil der Fäkalien erfasst.

Die Helmintheneier sind aber in den Exkrementen sehr ungleichmässig verteilt, sodass die Ergebnisse der Untersuchung stark verzeichnet sind.

Bei einigen Arbeiten stellten wir unter Anwendung quantitativer larvoskopischer und ovoskopischer koprologischer Methoden, zum Beispiel bei der koprologischen Untersuchung von Schafen und Wild, einige Unstimmigkeiten fest, und Sektionsbefunde zeigten, dass die Zahl der Würmer im Verdauungstrakt meistens der in den Fäkalien festgestellten Menge der Eier nicht entspricht. Wir sahen uns daher veranlasst, eine Reihe quantitativer Methoden zu überprüfen und ihre Bedeutung für die praktische Anwendung zu beurteilen.

Eigene Beobachtungen

In der ersten Arbeitsetappe wurden die quantitativen Veränderungen in der Zahl der Eier von Darmhelminthen bei zwei Versuchsböcken im Verlaufe von 27 Tagen ununterbrochen beobachtet. Die Untersuchung der Kotmenge von $\frac{1}{2}$ g erfolgte dreimal täglich (morgens, mittags und abends) nach der Methode von Willys. Die Larven der Lungenwürmer wurden nicht gezählt, da die Versuchstiere von diesen nicht befallen waren. Beide Böcke (Merino und Tzigaga) wurden im Hofe des Biologischen Instituts der Tschsl. Akademie d. Wissenschaften in Prag in einem kleinen Auslauf gehalten, der vollkommen vegetationslos war, täglich gereinigt und von sämtlichen Fäkalien gesäubert wurde, um eine allfällige Reinvasion zu verhüten. Der Versuch wurde im Oktober durchgeführt, also zu einer Zeit, in der eine hohe Invasion vorausgesetzt werden konnte.

Bei Auswertung der Versuchsergebnisse zeigte sich, dass die Zahl der Helmintheneier in der festgesetzten Gewichtsmenge der Fäkalien sich während eines Tages mehrmals stark verändert (Abb. 1). In diesen zahlenmässigen Schwankungen konnte keine Regelmässigkeit festgestellt werden, da sie völlig ungleichmässig verliefen.

Es wurde ferner berücksichtigt, dass beide Böcke fast ein ganzes Jahr vor unserem Versuch im Auslauf unter Bedingungen gehalten wurden, die eine Reinvasion unmöglich machten. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass einige Würmer das Adultstadium erreichten und durch Legen von Eiern die Schwankungen in der Zahl der abgegangenen Eier verursachen konnten. Bei Bewertung aller quantitativen Methoden muss auch dieser Umstand in Betracht gezogen werden, denn im Wirt können sich nichtgeschlechtsreife Würmer in grosser Zahl befinden, die mit koprologischen Methoden nicht zu erfassen sind. Vom pathogenetischen Gesichtspunkt aus ist es allerdings gleichgültig, ob es sich um geschlechtsreife oder um geschlechtlich halbreife Würmer handelt, die noch keine Eier legen; im Gegenteil, nichtadulte Würmer sind in einer Reihe von Fällen für den Wirtsorganismus gefährlicher als adulte Individuen (z. B. die in der Darmwand eingebohrten Larven von Nematoden und ähnl.).

Bei einem Bock wurde die tatsächliche Zahl der Würmer mit jener der abgegangenen Eier verglichen. 7 Tage vor der Tötung des Bocks wurde dreimal täglich die Menge der Eier von Darmhelminthen im Kot mit der Methode von Willys beobachtet und auch hier ein starkes Schwanken der Zahl im Verlauf des Tages ohne jedwede Regelmässigkeit festgestellt (Abb. 2). Nach Tötung des Bocks wurden

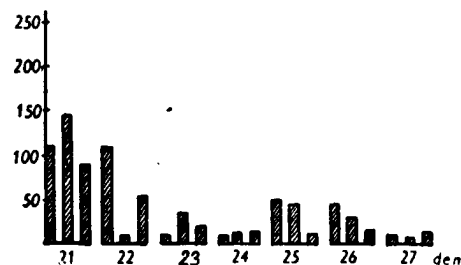
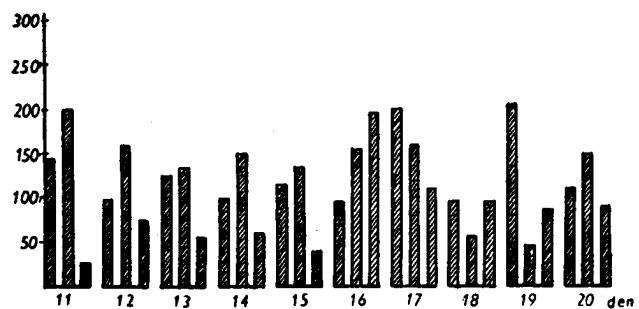
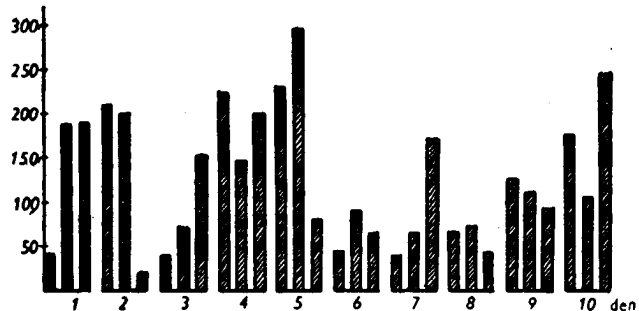


Abb. 1. Auf der Abszisse: Zeit in Tagen.

Рис. 1. Ось X: время в днях.

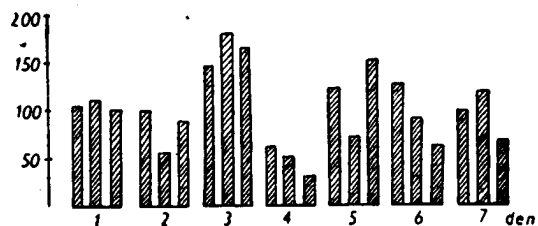


Abb. 2. Auf der Abszisse: Zeit in Tagen.

Рис. 2. Ось X: время в днях.

die im Verdauungstrakt befindlichen Würmer gezählt. Die helminthologische Sektion ergab folgenden Befund: *Haemonchus contortus*: 16 Exemplare (11 ♀, 5 ♂), *Ostertagia circumcincta*: 251 Exemplare (181 ♀, 70 ♂).

Im zweiten Arbeitsabschnitt wurden die Schwankungen in der Zahl von Eiern und Larven parasitischer Würmer in einzelnen Kotteilen untersucht. Bei zwei Böcken aus dem Forschungsinstitut für Schafzucht in Jedlová erfolgte im Verlaufe von zwei Tagen eine sechsmalige komplette Untersuchung des gesamten abgegangenen Kotes (Schafbohnen), wobei immer die Menge der Eier und Larven in den einzelnen Schafbohnen bestimmt wurde. Die Exkremente wurden vorher gewogen und die Eier nach der Methode von Willys, die Larven nach der Methode von Vajda gezählt. Die Anzahl der Schafbohnen bei einer Defäkation bewegte sich von 38 bis 82 Stück, ihr Gewicht betrug beim Bock Nr. 1 (Texel) durchschnittlich 0,71 g, beim Bock Nr. 2 (Stavropol) durchschnittlich 0,34 g. Die Gewichtsunterschiede waren meistens geringfügig und betrug durchwegs nur Hundertstel von Grammen. Das Untersuchungsergebnis zeigt die Tabelle 1.

Tabelle 1.

Unter- suchung	<i>Protostrongylus</i>		<i>Müllerius</i>		<i>Dictyocaulus</i>		Darmhelminthen		
	Keimzahl		Keimzahl		Keimzahl		Keimzahl		
	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	
Texel-Bock	I	—	28	11	56	—	13	28	379
	II	—	21	7	168	—	17	13	288
	III	—	26	6	125	—	3	20	348
	IV	—	20	7	106	—	16	20	322
	V	—	11	2	132	—	6	24	577
	VI	2	36	3	85	—	4	30	213

Die Darmhelmintheneier stammten meistens von Würmern der Gattungen *Ostertagia*, *Haemonchus* (*Haemonchus contortus*) und der Art *Chabertia ovina*. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei dem Stavropol-Bock gewonnen.

Die in der Tabelle angegebenen Resultate zeigen deutlich den grossen Unterschied in der Zahl von Eiern und Larven bei den einzelnen Schafbohnen. Auch wenn hier nur extreme Fälle angeführt sind, so ist die Streuung der Zahlen so gross, dass eine genaue Abschätzung der Invasionsintensität vollkommen unmöglich ist. Die quantitativen Methoden besitzen somit für die Praxis denselben Wert wie die normalen qualitativen Methoden: mit ihnen kann höchstens die Anwesenheit des einen oder anderen Parasiten nachgewiesen und die Invasionsstärke nur sehr ungefähr abgeschätzt werden, allerdings auch das nur unter Vorbehalt, da eine schwächere Invasion nicht festgestellt werden muss, wie in unserer Tabelle das Beispiel der Lungenwürmer der Gattungen *Protostrongylus* und *Dictyocaulus* zeigt. Bei allen koprologischen Untersuchungen kommt es sichtlich darauf an, wann die Fäkalien zur Untersuchung entnommen und welche Teile hiezu verwendet werden. Dabei ist es unmöglich, sich nach irgendeiner Regel zu richten, da sowohl das Legen der Eier als auch ihre Verteilung in den Exkrementen sehr unregelmässig ist. Bei der koprologischen Untersuchung (auch bei der qualitativen) ist daher die Analyse einer einzigen Probe für die Feststellung von Parasiten nicht hinreichend, sondern es müssen immer mehrere Proben, am besten aus verschiedenen Exkrementpartien untersucht werden. Als Beweis für diese Behauptung führen wir die Ergebnisse von Analysen der Exkremente eines Hirsches an, der

auf Anwesenheit von Lungenwürmern untersucht wurde: Die Gesamtzahl der Kotbohnen betrug 57; davon waren 27 völlig negativ, die restlichen 30 positiv, und zwar 22 auf Larven eines Wurmes der Gattung *Capreocaulus*, 5 auf Larven der Art *Dictyocaulus viviparus* und 3 auf Larven beider Arten. In diesem Falle hätte die Untersuchung einer einzigen oder einiger wenigen Proben wahrscheinlich keine genaue Feststellung aller schmarotzenden Helminthen-Arten erbracht.

Nach Feststellung der grossen Unregelmässigkeit in der Verteilung von Eiern und Larven in den Fäkalien waren wir bemüht, durch sorgfältige Vermischung der Exkremente eine wenigstens annähernd gleichmässige Streuung der Keime zu erzielen und auf diese Weise den Durchschnitt approximatativ festzustellen. Die Ergebnisse haben aber gezeigt, dass nicht einmal durch eine bei allen koprologischen Methoden empfohlene sorgfältige Vermischung der Fäkalien die erforderliche gleichmässige Verteilung der Keime erreicht werden kann. Unsere Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 2 enthalten.

Von Darmhelminthen waren die Eier der Arten *Ostertagia* sp., *Haemonchus contortus*, *Strongyloides papillosus* und *Chabertia ovina* vertreten.

Tabelle 2.

Vermischte Fäkalien				Unvermischte Fäkalien (Kontrolle)			
<i>Protostrongylus</i>	<i>Müllerius</i>	<i>Dictyocaulus</i>	Darmwürmer	<i>Protostrongylus</i>	<i>Müllerius</i>	<i>Dictyocaulus</i>	Darmwürmer
1	28	—	71	2	77	1	237
—	3	—	137	19	49	—	146
2	17	—	113	—	56	—	112
2	9	—	127	3	74	—	42
20	79	—	50	5	79	—	70
9	53	—	160	—	54	—	173
16	22	—	89	5	82	—	80

Diskussion und Zusammenfassung

In der bisherigen helminthologischen Praxis wurde auf die quantitativen koprologischen ovo- und larvoskopischen Untersuchungsmethoden grosser Wert gelegt. Diese Methoden bewährten sich hauptsächlich bei der Wirksamkeitskontrolle anthelminthischer Präparate, bei Verfolgung der Dynamik von Helminthosen und bei ökologischen Beobachtungen (Verbreitung der Helminthosen) u. dgl. Wir haben in unserer Arbeit gezeigt, dass die diesen Methoden beigelegte Bedeutung immer mit einer gewissen Reserve aufzunehmen ist und dass zumindest die bisherige Praxis aufgegeben werden muss, die sich bei der quantitativen Untersuchung mit einer, höchstens aber mit drei Proben der Exkremente begnügt. Die Gründe hierfür sind:

a) Die Eier und Larven gehen mit den Fäkalien sehr unregelmässig ab und ihre Zahl schwankt während des Tages einige male sehr stark, wodurch eine auch nur annähernde Abschätzung der Invasionsintensität, d. h. der Zahl von schmarotzenden Würmern im Wirtsorganismus unmöglich gemacht wird.

b) Die Eier und Larven sind in den Fäkalien sehr ungleichmässig verstreut; bei der Untersuchung kommt es darauf an, welche Partie der Exkremente hiezu verwendet wird. In beiden Fällen kann in dem Schwanken der Zahl von Eiern und Larven eine Periodizität oder Gesetzmässigkeit nicht festgestellt werden.

Auf Grund dieser Befunde kann daher eine Reihe von Ergebnissen verschiedener Arbeiten, die sich auf Resultate quantitativer koprologischer Untersuchungen stützen, nur mit Zurückhaltung beurteilt werden. Die Bedeutung der bisher angewandten quantitativen Methoden für die humane und veterinärmedizinische Praxis bedarf einer Umwertung besonders auf dem Gebiet der helminthologischen Kontrolle von Heilmittelwirkungen, bei Verfolgung saisonbedingter Helminthosen und überall dort, wo diese Methoden verwendet werden. Die bisher erzielten Ergebnisse können nicht als verlässlich angesprochen werden, da sie nicht wahrheitsgetreu sind und nur die Zahl der Keime im gegebenen Augenblick wiedergeben. Die quantitativen koprologischen Methoden unterscheiden sich in ihrer Bedeutung keinesfalls von den qualitativen Methoden, da sie verlässlich nur zur Feststellung der An- oder Abwesenheit eines Schmarotzers verhelfen. Ob im Wirtsorganismus eine grössere oder kleinere Zahl von Parasiten anwesend ist, kann mit diesen Methoden nur sehr ungefähr und unter Vorbehalt bestimmt werden.

L i t e r a t u r

- Heidegger, E.: Wurmtafeln zum Bestimmen der wichtigsten Haustierparasiten. Stuttgart 1937.
- Honess, R. F.: Common Helminths of Wyoming Sheep. Wyoming Agr. Exp. Station 305, 1951.
- Hovorka, J.: Nová metoda kvantitativneho určovania entoparazitárnych vajčiek. Čs. vet. 369, 1949.
- Hovorka, J.: Helmintologická diagnostika. I. Bratislava 1954.
- Koutz, F. R.: A Comparison of Flotation Solutions in the Detection of Parasite Ova in Feces. Am. J. Vet. 2 : 95, 1941.
- Koutz, F. K.: Parasitism in Domestic Animals. Speculum 4 : 6, 1951.
- Kreis, H. A.: Die Diagnose des Nematodenbefalles beim lebenden Tier, mit besonderer Berücksichtigung der Befunde beim Okapi „Bambi“. Acta tropica 7 : 151, 1950.
- Krug, S., Mayhew, R.: Studies on Bovine Gastrointestinal Parasites XIII. Species Diagnosis of Nematode Infections by Egg Characteristics. Transact. Microscop. Soc. 68 : 3, 1949.
- Liebig, J.: Parasitäre Haustierkrankungen im Kreis Nürtingen. Giessen 1951.
- Mayhew, R.: Studies on Bovine Gastrointestinal Parasites. IX. The Effects of Nematode Infections during the Larval Period. Cornell Veterinarian 34 : 4, 1944.
- Morgan, B. B., Hawkin, P. A.: Veterinary Helminthology. Minneapolis 1949.
- Ryšavý, B., Erhardová, B.: Příspěvek k diagnostice helminthiasí ovcí a spárkaté zvěře. Zool. entomol. listy 1 (15) : 115, 1952.
- Ryšavý, B., Erhardová, B.: Parasiti ovcí. Praha 1953.
- Tetley, J. H.: The differentiation of the Eggs of the Trichostrongylid Species Nematodirus filicollis and Nematodirus spathiger. J. Parasitology 27 (6) : 473, 1941.
- Zavadowsky, M. M., Zvjagnintzev, S. N.: The Seasonal Fluctuation in the Number of Eggs of Nematodirus sp. in Feces. J. Parasitology 9 : 263, 1933.

FOLIA BIOLOGICA

Том. II. (1956) — Fasc. 3.

К вопросу квантитативных копрологических методов исследования в гельминтологии

Б. ЭРГАРДОВА и Б. РЫШАВЫЙ

Биологический институт ЧСАН, паразитология, Прага

Копрологические методы исследования в гельминтологии все еще принадлежат к наиболее быстрым и надежным методам диагностики при определении инвазии паразитических червей человека и животных. Особенно часто эти методы применяются в ветеринарии. Они постоянно разрабатываются и уточняются, так что количество известных до настоящего времени методов и их модификаций доходит уже до нескольких десятков. Качественные копрологические методы диагностики особенно часто применяются в практической гельминтологии ввиду их сравнительной доступности, а главное — возможности их использования при массовых исследованиях людей и животных.

Другая же группа копрологических методов исследования — количественные копрологические методы, как овоскопические, так и лавроскопические, требует более углубленного внимания уже потому, что на их результатах строится ряд работ, имеющих значение, главным образом, в фармакологии (изучение действия лекарств), в эпизоотологии (динамика течения гельминтозов, сезонная динамика заболеваний) и т. п.

К наиболее распространенным и общепризнанным в настоящее время методам принадлежат методы Willys-a, Stoll-a, Vajd-a, Brumpt-a, Caldwell-a, Wetzel-я и целый ряд других. У нас Говорка (1949) разработал количественный копрологический метод, при котором используется специальная сетка для гематологической счетной камеры. С помощью всех этих методов можно сравнительно точно определить количество яиц в навеске помета исследуемой особи. Однако получаемая величина относится только к определенному и очень ограниченному отрезку времени: количество яиц или личинок в помете очень резко повышается или понижается уже через несколько часов и во всяком случае меняется по нескольку раз в день. Таким образом, с помощью количественного метода можно определить количество яиц, но только для данного отрезка времени и для данной части помета.

Однако в помете яички бывают рассеяны весьма неравномерно, что в значительной мере искажает получаемую в результате исследований картину.

При некоторых наших работах, пользуясь квантитативными лавроскопическими или овоскопическими методами (напр., при копрологических исследованиях овец или дичи), мы замечали известные противоречия в полученных нами результатах, а вскрытие показывало, что количество червей в пищеварительном тракте по большей части не отвечало количеству яиц, найденных в помете. Это побудило нас произвести проверку ряда количественных методов и оценку их значения для практики.

Собственные наблюдения

В первом этапе нашей работы в течение 27 дней производились непрерывные наблюдения изменений количества яиц кишечных гельминтов в помете 2 подопытных баранов. Помет в количестве 0,5 г исследовался три раза в день (утром, в полдень и вечером) по методу Willys-a. Личинки легочного червя не подсчитывались, так как подопытные животные не были ими заражены. Оба барана (меринос и цигаля) помещались в небольшом загоне на дворе Биологического института ЧСАН в Праге. В загоне не было никакой растительности. Он чистился ежедневно и помет устранялся во избежание возможной реинвазии. Опыт производился в октябре, когда можно предполагать наличие высокой степени инвазии.

При оценке результатов этого опыта оказалось, что количество яиц червей

в навеске помета резко меняется несколько раз в день (рис. 1). Нам не удалось отметить никакой закономерности в колебаниях количества яиц, — оно менялось в течение дня совершенно нерегулярно. Следует учесть, что до начала нашего опыта оба барана содержались в этом загоне, вне опасности реивазии, в течение почти целого года, так что нельзя предполагать, чтобы некоторые черви созрели в течение нашего опыта и, откладывая яйца, вызывали колебания в результатах наших подсчетов. При оценке всех квантитативных методов следует принимать во внимание и это, так как в хозяине может находиться значительное количество червей, не достигших половой зрелости, которые не поддаются исчислению с помощью копрологических методов. Но с точки зрения патогенеза, конечно, безразлично, идет ли речь о половозрелых червях — или о неполовозрелых, которые еще не откладывают яиц. Напротив, в ряде случаев неполовозрелые черви опаснее для организма хозяина, чем половозрелые (напр., личинки нематод, вгрызающиеся в стенки кишечника и т. п.).

У одного барана мы произвели сравнение истинного количества червей с количеством выделяемых яиц. В течение 7 дней до того, как баран был убит, количество яиц кишечных гельминтов в его помете подсчитывалось 3 раза в день с помощью метода Willys-a. И в этом случае наблюдалось резкое колебание количества яиц в течение дня при отсутствии какой бы то ни было закономерности (рис. 2). При вскрытии были подсчитаны черви в пищеварительном тракте. Результаты гельминтологического вскрытия: *Haemonchus contortus*: 16 экземпляров (11 ♂ и 5 ♀), *Ostertagia circumcincta*: 251 экземпляр (181 ♀, 70 ♂).

Во второй части работ производились исследования колебаний количества зародышей паразитических червей в отдельных частях помета. У двух баранов из Исследовательского института овцеводства в Едловой 6 раз в течение 2 дней полностью исследовался весь выделявшийся ими помет. Определялось всегда количество яиц и личинок в отдельных шариках помета. Шарик предварительно взвешивались, а зародыши (яички и личинки) подсчитывались по методу Willys-a (яички) и по методу Vajd-a (личинки). Количество орешков помета при одной дефекации колебалось от 38 до 82, вес отдельных орешков у барана № 1 (тексельский) бывал в среднем 0,71 г, у барана № 2 (ставропольский) — в среднем 0,34 г. По весу отдельные орешки отличались друг от друга лишь незначительно (различия только в сотых долях грамма). Результаты исследований приводятся в табл. 1.

Из кишечных червей больше всего было яиц червей из родов *Ostertagia*, *Haemonchus* (*Haemonchus contortus*), а также вида *Chabertia ovina*. Аналогичные результаты были получены и у ставропольского барана.

Таб. 1.

Исследования	Protostrongylus		Müllerius		Dictyocaulus		Кишечные гельминты		
	Количество зародышей		Количество зародышей		Количество зародышей		Количество зародышей		
	мин.	макс.	мин.	макс.	мин.	макс.	мин.	макс.	
Баран тексельский	I	—	28	11	56	—	13	28	379
	II	—	21	7	168	—	17	13	288
	III	—	26	6	125	—	3	20	348
	IV	—	20	7	106	—	16	20	322
	V	—	11	2	132	—	6	24	577
	VI	2	36	3	85	—	4	30	213

Из данных таблицы очевидна значительная разница в количестве зародышей в отдельных орешках. В таблице приводятся только крайние случаи, но тем не менее вариационный размах количества находимых яичек настолько велик, что доказывает совершенную невозможность точного определения размеров инвазии по яичкам. Для практики квантитативные методы дают не больше, чем нормальные качественные диагностические методы: с их помощью можно только доказать наличие того или иного паразита и лишь приблизительно определить размеры инвазии, да и то с оговорками: незначительная инвазия может остаться совсем незамеченной, как показывает в нашей таблице пример легочных червей родов *Protostrongylus* и *Dictyoscaulus*. Повидимому, результаты копрологических исследований меняются в зависимости от того, когда берется помет для исследований и какая часть их используется. При этом невозможно руководствоваться каким-нибудь правилом, так как и откладывание яичек червями, и их рассеяние в помете отличаются совершенной неправильностью. Поэтому при копрологическом исследовании (даже качественном) для выявления паразитов недостаточно одного образца, а необходимо исследовать всегда несколько образцов и лучше всего из разных частей помета. В качестве доказательства этого утверждения приводим результаты разбора оленьего помета, который исследовался нами на присутствие личинок легочных червей: общее количество шариков помета было 57, из чего 27 штук было совершенно негативных, а 30 других — позитивных, но в 22 из них были найдены личинки червя из рода *Саргеосаулюс*, в 5 личинки вида *Dictyoscaulus viviparus*, а в 3 — личинки обоих видов. В этом случае исследование одного только или немногих образцов, вероятно, не обеспечило бы выявления всех видов паразитов.

Убедившись в значительной неравномерности распределения яичек и личинок в помете, мы пытались путем тщательного перемешивания помета добиться по крайней мере приблизительно равномерного рассеяния зародышей, чтобы получить хотя бы приблизительные средние показатели. Полученные нами результаты показали, что даже при самом тщательном перемешивании помета, которое рекомендуется при всех копрологических методах, требуемая равномерность рассеяния зародышей не достигается. Результаты этого опыта показаны в табл 2.

При этом опыте были найдены яички следующих видов кишечных червей: *Ostertagia* sp., *Haemonchus contortus*, *Strongyloides u papillosus* и *Chabertia ovina*.

Таб. 2.

Перемешанный помет				Неперемешанный помет (контроль)			
Proto-strongylus	Müllerius	Dictyo-caulus	Кишечные черви	Proto-strongylus	Müllerius	Dictyo-caulus	Кишечные черви
1	28	—	71	2	77	1	237
—	3	—	137	19	49	—	146
2	17	—	113	—	56	—	112
2	9	—	127	3	74	—	42
20	79	—	50	5	79	—	70
9	53	—	160	—	54	—	173
16	22	—	89	5	82	—	80

Дискуссия и резюме

В гельминтологических работах последнего времени количественным копрологическим — ово- и ларвоскопическим — методам исследования придавалось очень большое значение. Эти методы применялись, главным образом, для кон-

троля действия антигельминтических препаратов, при исследовании динамики гельминтозов, при экологических исследованиях (напр., распространения гельминтозов) и т. п. В своей работе мы показали, что результаты, полученные с помощью этих методов, следует принимать с большой осторожностью и уж во всяком случае нужно отказаться от общепринятой практики, когда для количественных исследований берется только один, или в крайнем случае три образца помета, так как:

а) яйца и личинки выделяются с пометом очень неравномерно и их количество резко меняется по нескольку раз в день, что делает невозможной даже приблизительную оценку размеров инвазии, т. е. количества паразитических червей, находящихся в организме хозяина;

б) яйца и личинки рассеяны в помете весьма неравномерно, и все зависит от того, какая часть помета была случайно взята для исследования. При этом невозможно установить никакой закономерности или периодичности колебаний количества зародышей.

Ввиду сказанного следует с большой осторожностью относиться к результатам целого ряда самых разнообразных работ, опирающихся на количественные копрологические методы. Необходима новая оценка значения количественных методов, применяющихся в медицинской и ветеринарной практике, в вопросах гельминтологического контроля действия лекарств, исследований сезонной динамики гельминтозов и вообще всюду, где использовались эти методы. На полученные до сих пор результаты нельзя полагаться, — они показывают не истинное положение вещей, а только количество зародышей, найденное в данный момент. По своему значению количественные копрологические методы ничем не отличаются от качественных, так как с их помощью можно с уверенностью установить только наличие или отсутствие какого-нибудь паразита и только в общих чертах и с большими оговорками определить, что в животном-хозяине находится большое или небольшое количество паразитов.

FOLIA BIOLOGICA

Том. II. (1956) — Fasc. 3

К вопросу эпидемиологии столбура в ЧСР, в особенности столбура картофеля

Ц. БЛАТТНЫЙ, Я. БРЧАК, Я. ЛИМБЕРК и В. БОЙНЯНСКИЙ

Биологический институт ЧСАН, фитопатология, Прага, и Исследовательский институт растениеводства, Боровцы

Поступило в редакцию 31 I 1956

Основы эпидемиологии столбура были впервые выяснены Суховым и Вовком (1946). Исследования, производившиеся в нашей стране с 1951 г., показывают, что и признаки, и распространенность заболевания в высокой степени зависят от климатических условий. Влажная и холодная погода ослабляет признаки заболевания у растений; у картофеля завядание иногда уже не наблюдается. В 1954 г. мы собрали (Брчак, Блаттный, Поздена 1955) первые данные относительно латентных или трудно распознаваемых — на основании внешних признаков — форм столбура у картофеля. Одновременно выяснилось, что эпидемиология столбура не исчерпывается одними только его отношениями к вьюнку и к переносчикам и что таксономическая классификация всей группы вирусных заболеваний этого типа требует новых сравнительных исследований.

Проверка очагов столбура вьюнка в Чехии

В предшествовавшей работе (Брчак 1955) мы опубликовали находки столбура вьюнка в Чехии и наметили вероятные границы его распространения. Мы считали необходимым проверить значение этих очагов. Опыты были поставлены в Доле у Либчиц и в Лоденицах под Бероуном. В обоих случаях это были виноградники, где на межах и на террасах в изобилии встречался полевой вьюнок (*Convolvulus arvensis* L.), зараженный столбуром. Пасленовых растений, зараженных столбуром, в близкой округе не было.

Между растениями больного вьюнка и по соседству с ними были посажены в 2 срока томаты одного сорта, которые через известное время были вновь переизезены в Прагу и пересажены в оранжерею.

Таблица 1.

Место опыта	Количество зараженных / количество посаженных томатов в очаге	
Дол у Либчиц	(16 V — 30 VI 1955) 0,30	(30 VI — 9 IX 1955) 2,24
Лоденицы	(26 V — 1 VII 1955) 0,30	(1 VII — 9 IX 1955) 2,22

Заражение томатов столбуром произошло только в июле. Этим подтвердились наши прежние предположения относительно практического значения подобных

очагов, иногда пребывающих в покое. Несмотря на то, что томаты были все одного посева, между ними проявилась разница в признаках заболевания на обоих местах произрастания: в Доле у Либчиц столбур вызывал, главным образом, полную атрофию венчиков и значительную гипертрофию чашечек, какая в Чехии до сих пор не встречалась. В Лоденицах столбур томатов проявлялся полной атрофией венчиков, но без гипертрофии чашечек; зато здесь



Рис 1. Признаки столбура у помидора, зараженного в полуприродном очаге в Доле у Либчиц. (Фото д-р Я. Брчак.)



Рис 2. Влево здоровая, вправо пораженная вирусом астра из Дола у Либчиц. (Фото д-р Я. Брчак.)

наблюдались сильная антоцианизация и одревенение, а главным образом, значительная (иногда же полная) редукция и хлороз верхушечных листиков. Мы полагаем, что это — два различных штамма столбура. В Доле у Либчиц мы при последнем контроле инфекции (20 IX 1955) впервые нашли столбур томатов и в одном соседнем огороде. В культуре астр (*Callistephus sinensis*) нами было найдено несколько растений с признаками, напоминающими вирусное заболевание «aster yellows». Эти случаи мы тоже относим за счет естественной передачи столбура из очага заболевания вьюнка.

Передача столбура картофеля потомству через клубни

Вопрос о том, передается ли столбур потомству с клубнями, важен и с научной, и с практической точки зрения. С научной потому, что, если бы столбур не передавался по наследству через клубни, он составлял бы почти единственное исключение среди виروزов картофеля и остальных вегетативно размножающихся растений. С практической потому, что вегетативная передача вироза культурным растениям означает возможность устойчивого поддержания и постоянного рас-

пространения источника инфекции. Сухов и Вовк (1949, 1950) утверждают, что т. н. южный столбур (в отличие от северного) практически не передается потомству с клубнями картофеля. В своей работе 1952 г. эти авторы подробно излагают, как у потомства больного столбуром картофеля проявляется нитевидность ростков. В предшествовавших работах (1949, 1950) они указывали, что нитевидные ростки клубней картофеля, зараженного южным столбуром, не содержат вируса столбура.

В своей работе мы исходили из следующих фактов: 1. хорошо известные вирусы картофеля передаются потомству через клубни; 2. южный столбур имеет несколько признаков, кроме завядания, которое не обязательно; 3. нитевидные ростки находятся в связи с наличием столбура в культуре картофеля в предшествовавшем году (Сухов и Вовк 1952); 4. для проверки того, действительно ли подозрительные признаки у картофельной ботвы вызваны столбуром, достаточно привить части такой ботвы на томаты, у которых столбур проявляется со всей очевидностью.

Материалом для опытов 1955 г. нам служили:

1. Клубни сорта Триумф из Кршечовиц район Кутна Гора), с поля, на котором в 1954 г. у некоторых растений появились признаки, напоминающие столбур. В этой группе были клубни растений, у которых болезненные признаки не проявлялись, всего 1000 клубней. (Подробности в статье Брчак, Блатный, Повдена 1955.)

2. Клубни сорта Триумф с того же поля, от растений, у которых в 1952—54 гг. на ботве наблюдались признаки, напоминающие столбур, т. е. редукция верхушечных листьев, их антоцианизация, рост прямо вверх. Всего 25 клубней.

3. Клубни сорта Триумф из Праги-Дейвиц от растений 1954 г. с признаками, напоминавшими столбур: рост прямо вверх, редукция верхушечных листьев и их антоцианизация. Всего 48 клубней.

4. Клубни сорта Триумф с того же поля, у которых в 1954 г. признаки столбура не проявлялись — всего 200 клубней.

5. Клубни сорта Эрстлинг, с нитевидными ростками, найденные нами весной 1955 г. среди прораставшего картофеля в окрестностях Лысой над Эльбой — всего 8 клубней.

6. Клубни сорта Эрстлинг из Погорелиц в Моравии, не имевшие в 1954 г. признаков заболевания столбуром — всего 360 клубней.

7. Два клубня сорта Триумф с нитевидными проростками из г. Иглава.

8. Клубни различных сортов из Погорелиц в Моравии, взятые с полей, где наблюдалось столбурное завядание, но от растений, которые не завядали. Рассажены были только клубни, у которых появились нитевидные ростки, — по 60 клубней от каждого из 21 сорта: а) I/4 — Bekete, б) I/48 — Depesche, в) I/93 — Homeguard, д) I/147 — Nigela, е) I/70 — Flora, ф) I/116 — Корневский г) I/134 — Marta, h) I/40 — Centa, ch) I/50 — Dianella, i) I/98 — Imperia j) I/72 — Fridolin, k) I/74 — Frühmölle, l) I/76 — Geoblom, m) I/130 — Lorch, n) I/139 — Merkur, o) I/16 — Aquilla, p) I/13 — Arnika, q) I/43 — Cobler, r) I/124 — Ledvinky s) I/5 — Alanah, t) I/120 — Красноуфимский. Всего 1260 клубней.

В общем было рассажено и оставалось под наблюдением в течение всего периода вегетации, начиная с ростков, 2903 клубня.

Состояние здоровья растений расценивалось только с точки зрения столбура. Остальные вирусные и грибковые заболевания не принимались во внимание. Часть опытной делянки находилась в тени. 1955 г. был холодный, влажный и бедный прямыми солнечными лучами вплоть до половины сентября. Завядание не наблюдалось ни у одного растения. У томатов и табака (приблизительно 600 растений), рассаженных в непосредственном соседстве подопытного картофеля, не наблюдалось ни одного случая столбура. В огороде нет столбурного вьюнка и не была найдена цикадка *Hyalosthes obsoletus* Sign. Большая часть картофеля в течение всего периода вегетации росла в теплице. На делянке признаки заболевания картофеля были отмечены уже у молодых растений. Все клубни прорастали на лотках в теплице. Стебли, выросшие из клубней с нитевидными ростками, бывали всегда тоньше, чем стебли из клубней с нормальными

ростками. Существуют и переходные формы, — не только по толщине, но и по форме ростков: бывают, напр., на толстом главном стебле тонкие боковые побеги. Нитевидность проявлялась выразительнее, если после недельного прорастания на свету лотки 1—2 недели бывали в темноте.



Рис. 3: Вид пораженного столбуром картофеля, выросшего из клубня с нитевидными проростками. (Сорт 1/70, Погорелицы, фото Я. Кубец.)

Группа 8: ростки в 97% случаев нитевидные, а у остальных переходной формы. У приблизительно 20% растений из клубней с нитевидными ростками были почти нормальные стебли. У остальных стебли бывали тонкими, у некоторых наблюдался рост более или менее прямо вверх и редукция, иногда полная, верхушечных листьев, особенно основных. У некоторых растений бывали антоцианизированные, желтоватые, розоватые, красноватые и даже сиреневатые верхушечные листья. Доля растений с симптомами столбура в отдельных группах: а) 4/60, б) 1/60, в) 0/60, д) 0/60, е) 10/60, ф) 1/60, г) 2/60, г) 1/60, ч) 0/60, и) 2/60, j) 5/60, к) 0/60, л) 2/60, м) 1/60, н) 2/60, о) 0/60, п) 0/60, q) 7/60, р) 2/60, s) 0/60, t) 0/60. Всего 3,17% этой группы.

Табл. 2. Признаки столбура картофеля у групп 1—7.

Группа	Нитевидность ростков	Редукция листьев, розоватость	Тонкие стебли
1	0/1000	0/1000	0/1000
2	25/25	3/25	0/25
3	14/48	1/48	0/48
4	0/200	2/200	0/200
5	8/8	2/8	6/8
6	?/360	0/360	?/360
7	2/2	2/2	2/2

Таблица 3.

Сорт	день прививки (1955 г.)	Признаки столбура (результаты за 20/IX—1/X 1955)
a) I/24 Bekete	2 VIII	3/6
e) I/70 Flora	1 VIII	4/6
j) I/72 Fridolin	13 VIII	4/7
q) I/43 Cobler	1 VIII	2/5

Верхушки растений с признаками столбура, — т. е. с редукцией верхушечных листков, или с их розоватостью, хлорозом или ростом прямо вверх, — были привиты в расщеп здоровым растениям тепличных томатов. (Передачи столбура с привоями, которые не срастались с подвоями, мы добивались в предшествовавшем году — Брчак, Блатный, Поздена 1955.) Привои выживали в течение 4—10 дней, срост не наблюдался ни в одном случае.

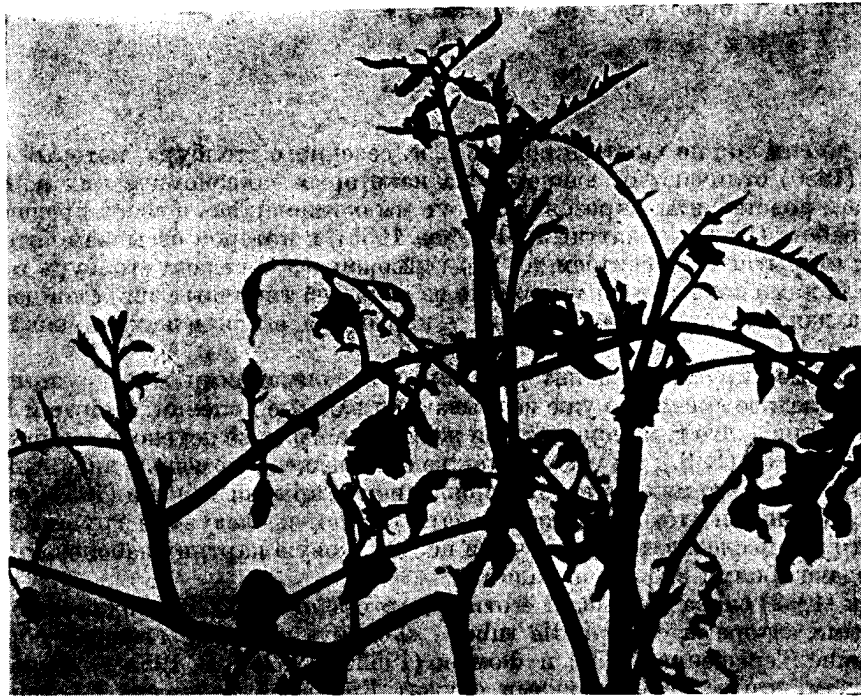


Рис. 4. После прививки побегов больного картофеля I/70 на томаты — на подвое появились характерные признаки столбура. (Фото Я. Кубец.)

Опыты доказывают, что столбур картофеля передается потомству клубнями. Пока это было доказано только для 13 из 40 растений из клубней с нитевидными ростками. Ботва этих растений проявляла аналогичные признаки. В опыте с 21 сортом процент переноса признаков колебался от 0 до 16% и в среднем у всех сортов составлял 3,17% случаев. Задина (1955) перенес столбур с карто-

фельных подвоев с нитевидными ростками на томаты только в 2 случаях из 197 привитых.

На основании наших опытов можно заключить, что наряду с пригодными очагами столбура, — прежде всего полевым вьюнком, — существует еще один опасный источник инфекции — картофельные клубни. Даже если заражение столбуром проявляется в форме нитевидных ростков, оно не обязательно завершается открытым заболеванием, и в особенности завяданием.

В 1955 г. мы находили изредка случаи столбура картофеля в Чехии также в районе г. Писек (Войников) и дважды в Весели над Лужницей, где до сих пор не был найден столбурный вьюнок и где мало вероятно наличие *Hyalesthes obsoletus*. Эти факты опять-таки указывают или на перенос с клубнями, или на возможность существования еще других хозяев и переносчиков. Брчак находил в 1955 г. столбур картофеля в Болгарии гораздо раньше, чем у других растений, в период, когда картофель не мог еще быть заражен имаго *Hyalesthes obsoletus*. Бойнянский нашел 18 VI 1955 в Боровцах на поле картофеля неизвестного сорта 3 куста (из 1000), зараженные столбуром, но не вянущие. 12 VIII 1955 все 3 растения были выкопаны. В настоящее время их клубни дали нитевидные проростки. Это — также случай появления столбура картофеля раньше появления первых имаго *H. obsoletus* (в начале июля).

Дискуссия

У нас до сих пор не выяснен вопрос т. н. северного столбура, который Сухов и Вовк (1950) отличают от южного. На некоторых таксономических вопросах столбура и родственных виروزов в Европе мы остановились в своей предшествовавшей работе (Брчак, Блатный, Поздена 1955), к которой отсылаем читателя. Важным открытием мы считаем то, что возможность передачи столбура с клубнями была нами доказана на материале из областей типичных эпидемий южного столбура даже в тех случаях, когда у картофеля его признаки проявлялись слабо.

Зарубежные вирусологи заинтересовались заболеваниями этой группы лишь в самое последнее время, но уже вскрываются важные явления: Heinze и Kunze (1955) убедились, что т. н. европейская желтуха астр тоже переносится цикадкой *Macrostelus laevis* (Rib.); им удалось также ее передача с помощью вида *Aphrodes bicinctus* Schrk., что является подтверждением открытия Брчака (1954) относительно способности этого вида передавать вирусы исследуемой группы. Интересно, что эти исследователи получили неодинаковую картину заболевания при его передаче обоими видами цикадки.

Фомюк (1952) снова описывает «готику картофеля» в СССР, отождествляемую некоторыми авторами со «spindle tuber». «Готику» изучали, главным образом, на Украине Терещенко (1937) и Фомюк (1952а, 1952б). В 1955 г. Фомюк сообщила нам, что ее переносчиками служат *Empoasca flavescens* F., *Eupteryx atropunctata* Goeze и *Aphidula nasturtii* Kalt., но что она передается также механически, с соком.

Этиологию заболевания «spindle tuber», описанного Schultz-ом и Folsom-ом (1925), приходится также считать невыясненной. Его переносят (Heinze 1951) 4 вида рода *Melanoplus*, *Leptinotarsa decemlineata* Sey., *Systema elongata* F. и *S. taeniata* Say., *Disonycha triangularis* Sey., *Epitrix cucumeris* Harr., *Lygus pratensis* L., *Myzodes persicae* Sulz., *Macrosiphon solanifolii* Ashm. По Smith-y (1937), это заболевание (*Solanum virus 12* Schultz et Folsom) передается и соком, и привоями, и клубнями.

У «готики» (Фомюк 1955, не изд.) среди потомства встречаются нитевидные ростки, но они не характерны для заболевания. Летняя посадка усиливает проявления заболевания (у столбура — снижает). Важно, что ранние сорта страдают «готикой» меньше других, полупоздние — уже больше, а больше всего — поздние, и что «готика» наследуется через клубни.

В 1955 г. мы несколько раз видели в СССР растения, больные «готикой», которая напоминала легкое заболевание столбуром. По нашему мнению, необходимо пересмотр вопроса, какие виды насекомых являются переносчиками этого заболевания. Мало вероятно, чтобы один и тот же вирус переносился и цикадками, и тлей, и механически, с соком. Скорее «готика» и «spindle tuber» вызываются не одним и тем же вирусом, а каждая из этих инфекций — комплексное заболевание, имеющее отношение и к столбуру.

Практические выводы для борьбы со столбуром

1. Борьба с сорняком, хозяином столбура, — в первую очередь с вьюнком.
2. Борьба с переносчиками столбура, главным образом с *Hyalosthes obsoletus*, а именно с нимфами в почве при помощи НСН и с имаго при помощи DDT, в зависимости от сроков их вылета, — и на некультивируемой почве.
3. Посадка картофеля летом — средство ненадежное. Чтобы оно стало надежным, необходимо было бы отодвинуть сроки посадки в июле подальше, но это отразилось бы уже неблагоприятно на размерах урожая.
4. Выгоднее было бы садить проросшие клубни ранних сортов картофеля (Erstling, Kitting, Bintje, Ambra, Defesche, Frühmölle и т. п.): их вегетация заканчивается так рано, что даже в случае инфекции в начале июня они избегали бы катастрофического завядания ботвы и клубней.
5. Следует посвящать пристальное внимание состоянию и происхождению картофельной рассады и проверять, не вызывается ли нитевидность ростков не только столбуром. Мы показали, что клубни с нитевидными ростками в 3,17% случаев передавали столбур потомству. Это — опасный источник инфекции. В теплых местностях необходимо поэтому давать картофелю прорасти и устранять все клубни с нитевидными ростками и переходные формы. (При некотором затенении признаки нитевидности проявляются выразительнее.) Наиболее правильно было бы впрочем, — и этому отвечает опыт разведения раннего картофеля в южной Моравии, — завозить каждый год новую, здоровую картофельную рассаду из областей, свободных от столбура.

Нельзя рекомендовать ввоз картофельных клубней из областей распространения столбура в такие области, где он не встречается, — даже только для целей исследования.

Резюме

Было установлено, что больной столбуром картофель завядает не всегда.

Очаги столбура вьюнка в Чехии проверялись так, что в них рассаживались томаты, заражение которых столбуром наблюдалось в июле. Из 2 очагов были получены 2 различных по симптомам штамма столбура.

Далее была установлена возможность передачи столбура картофеля клубнями. Были посажены клубни различных сортов картофеля с нитевидными ростками. Некоторые растения с самого же начала роста проявляли признаки столбура. В начале августа подозрительные побеги были привиты на томаты, у которых через 50—60 дней проявились характерные симптомы столбура (у 13 из 24 привитых), — и после гибели привоев. У картофеля с нитевидными ростками, взятого из области южного столбура (южная Моравия), передача столбура клуб-

ниями наблюдалась в 3,17% случаев. Наследственной передачей можно объяснить и появление столбура у картофеля в период, когда еще не летают имаго *Hyalesthes obsoletus*.

В дискуссии авторы развивают далее сравнение некоторых вирусных заболеваний картофеля со столбуром, указывая на некоторое его подобие со «spindle tuber» и «готикой».

В заключении авторы дополняют указания по борьбе со столбуром, в особенности рекомендуя, — наряду с борьбой с вьюнком и переносчиками, — пользоваться проросшими клубнями ранних сортов. При этом следует устранять клубни с нитевидными ростками и пользоваться только рассадой из областей, где нет столбура.

Л и т е р а т у р а

- Су х о в, С. К. и В о в к, А. М.: Цикадка *Hyalesthes obsoletus* Sign. — переносчик столбура пасленовых. ДАН СССР 53 (2) : 153, 1946.
- Су х о в, С. К. и В о в к, А. М.: Столбур пасленовых. Москва-Ленинград 1949.
- Су х о в, С. К. и В о в к, А. М.: Дифференциальные различия между северным и южным столбуром. Тр. инст. ген. 17, 1950.
- Су х о в, С. К. и В о в к, А. М.: Восстановление морфологии ростков клубней в потомстве растений картофеля, пораженных столбуром. Тр. инст. ген. 19 : 240, 1952.
- Т е р е щ е н к о, О. И.: Нова хворобата картопли. Сад та город 10, 1937.
- Ф о м ю к, М. К.: О готике картофеля. Киев 1952, сеп.
- Ф о м ю к, М. К.: Влияние разных температур и влажности почвы на болезни вырождения картофеля. Киев 1952, сеп.
- B l a t t n ý, C., B r č á k, J., P o z d ě n a, J., D l a b o l a, J., L i m b e r k, J., B o j ň a n s k ý, V.: Die Übertragung des Stolburvirus bei Tabak und Tomaten und seine virogeographischen Beziehungen. Phytopath. Zschr. 22 : 381, 1954.
- B r č á k, J.: Nový přenašeč stolburu (bezsemennosti) rajčete a tabáku — křísek *Aphrodes bicinctus* Schrk. Zool. a ent. listy 3 : 231, 1954.
- B r č á k, J.: Příspěvek k ekologii přenašeče stolburu — *Hyalesthes obsoletus* Sign. a k jeho rozšíření, zejména v Čechách. Ročenka Čs. spol. ent. 52, 1955.
- B r č á k, J., B l a t t n ý, C., P o z d ě n a, J.: Další příspěvek k poznání stolburu v ČSR. Polnohospodárstvo 2 : 433, 1955.
- H e i n z e, K.: Die Überträger pflanzlicher Viruskrankheiten. Mitt. Biol. Zentralanst. Land. Forstw. Berlin 71 : 126, 1951.
- H e i n z e, K., K u n z e, L.: Die europäische Ästerngelbsucht und ihre Übertragung durch Zwergikaden. Nachrichtenbl. des Deut. Pflanzenschutzd. 7 : 161, 1955.
- S c h u l t z, E. S., F o l s o m, D.: Infection and Dissemination Experiments with Degeneration Diseases of Potatoes. J. Agric. Res. 30 : 493, 1925.
- S m i t h, K. M.: A Textbook of Plant Virus Diseases. London 1937.

Beitrag zur Stolbur-Epidemiologie in der ČSR unter besonderer Berücksichtigung der Kartoffeln

C. BLATTNÝ, J. BRČÁK, J. LIMBERK und V. BOJŇANSKÝ

Zusammenfassung

Auf Grund unserer Beobachtungen in den Jahren 1951—1955, dass die während der Vegetationszeit herrschenden klimatischen Verhältnisse bei landwirtschaftlich wichtigen Solanaceen (z. B. Kartoffeln, Paprika, Tomaten, Tabak) auch die Intensität der Symptome beeinflussen, wurde festgestellt, dass die Stolburerkrankung der Kartoffeln nicht immer vom Welken begleitet sein muss, das sich besonders bei sonnigem, warmem und trockenem Wetter einstellt. Wir haben aus der Ökologie der Zikade *Hyalesthes obsoletus* Sign. unter unseren Bedingungen und auf Grund

des Studiums der Stolburherde an der Ackerwinde (*Convolvulus arvensis* L.) den Schluss gezogen, dass die Zusammenhänge zwischen dem Hauptüberträger des Stolburs, der angeführten Zikade, und der Ackerwinde als Hauptnährpflanze und zugleich wichtigsten Reservoirpflanze das Auftreten des Stolburs bei den Kartoffeln nicht restlos zu erklären vermögen.

Untersuchungen über die Effektivität der Ackerwindenherde des Stolburs in Mittelböhmen. Es handelte sich um zwei natürliche Herde des Stolburs an Ackerwinden auf Weinbauterrassen, in deren Umgebung keine stolburkranken Kulturpflanzen vorkamen. An beiden Stellen wurden in zwei Serien je 22—30 Tomatenpflanzen derselben Sorte und von gleichem Alter unter die an Stolbur erkrankten Ackerwinden ausgesetzt. Die erste Serie befand sich in den Herden von Mitte Mai bis Ende Juni, die zweite Serie von Anfang Juli bis 9. September. Von der ersten Serie erkrankte keine Pflanze, von der zweiten erkrankten in beiden Herden je 2 Pflanzen. Die Tomatenpflanzen zeigten in beiden Herden so sehr verschiedene Symptome, dass wir geneigt sind, diese Verschiedenheit als Ausdruck einer Stammesdifferenz anzusehen.

In der weiteren Umgebung einer der beiden Versuchsstellen fanden wir stolburkranken Ackerwinden und Tomaten, in geringer Entfernung Astern (*Callistephus sinensis*), welche eine Verminderung der Blütenstände und der Blüten-Vireszenz aufwiesen, also Symptome, die der Astern-Gelbsucht sehr ähnlich sind.

Mit der Lösung der Frage des „südlichen“ und des sogenannten „nördlichen“ Stolburs haben wir uns in der vorliegenden Arbeit nicht befasst. Das Material der Kartoffelknollen, mit dem wir im anderen Abschnitt unserer Arbeit experimentierten, stammte aus Gebieten, in welchen der typische südliche Stolbur im Jahre 1954 massenhaft auftrat. Bei dem südlichen Stolbur war man bisher der Ansicht, dass diese Viruskrankheit — zum Unterschied von den anderen bekannten Viruskrankheiten der Kartoffeln — nur in vereinzelten Fällen durch Knollen auf die Nachkommenschaft übertragen werden kann. Es ist seit langem bekannt, dass Kartoffelstauden, sofern sie infolge einer Stolburerkrankung welken und nur mildere Stolbursymptome aufweisen, meistens Knollen liefern, welche Fadenkeimigkeit zeigen. In unseren Versuchen haben wir bei insgesamt 2903 Knollen, bzw. bei den ihnen entstammenden Pflanzen den Gesundheitszustand verfolgt. Darunter befanden sich 1260 Knollen von 21 Sorten, die aus den Feldern von Pohorelice in Südmähren stammten, wo im Jahre 1954 ein starkes Auftreten des Stolburs verzeichnet wurde. Diese südmährischen Knollen hatten zu 97% Fadenkeime. Die Knollen mit Fadenkeimen wurden isoliert ausgesetzt und der Gesundheitszustand der Stauden vom Auflaufen an verfolgt. Bei durchschnittlich 3,17% dieser Pflanzen zeigten sich die Symptome des Stolburs schon von Jugend an, bei den einzelnen Sorten von 0—16%. Es waren dies Symptome eines milden Stolburs: gotisch aufgerichteter Wuchs, Verdünnung der Stengel, Reduktion der Fiederblätter, gelbliche oder rötliche Verfärbung der Gipfelpartien. Sowohl bei den Pflanzen als auch bei den Knollen kam es in keinem einzigen Fall zur Welkung (der Versuch wurde in Prag-Dejvice durchgeführt, das Wetter war ständig kühl und arm an Sonnenschein). Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei den angeführten Krankheitssymptomen tatsächlich um Stolburphänomene handelt, wurden in der ersten Augushälfte 24 Gipfelpartien von kranken Kartoffelpflanzen auf im Glashaus gebaute, gesunde Tomatenpflanzen gepfropft. Nach Mitte September zeigten 13 Tomatenpflanzen typische Stolbursymptome. Wir bemerken hiezu, dass keiner der Pfropfe mit der Unterlage zusammengewachsen war, dass jedoch die Pfropfe 4—10 Tage in enger Berührung mit der Unterlage waren und am Leben blieben.

Da andere Quellen des Stolburs nicht vorhanden waren und die Pfropfung positiv verlief (ein 100%iges Ergebnis konnte mangels des Zusammenwachsens von Pfropf und Unterlage nicht erzielt werden), erblicken wir in dem geschilderten Versuch

einen positiven Beweis dafür, dass der Stolbur bei Kartoffeln auf die Nachkommenschaft auch durch Knollen übertragen werden kann. Dafür sprechen auch wiederholte Beobachtungen (Bulgarien, Südslowakei), dass in den Kartoffelbeständen der typische Stolbur bereits lange vor dem Zeitpunkt auftritt, in dem sein Hauptüberträger, die Zikade *Hyalesthes obsoletus* Sign, erst den Boden verlässt. Diese Annahme wird ferner durch Beobachtungen in Böhmen, und zwar bei Lagen unterstützt, wo weder stolburranke Ackerwinden wachsen, noch die Zikade *Hyalesthes obsoletus* lebt: auch hier kommt der Stolbur bei Kartoffelstauden ganz vereinzelt vor.

Die Knollen der stolburkranken Kartoffelpflanzen sind entweder typisch fadenkeimig oder die Keime nicht total fadenförmig. Es bestehen auch weitere Hinweise darauf, dass die Stolburerkrankung auch durch scheinbar gesunde, nicht fadenkeimige Knollen übertragen werden kann. Darüber eine völlige Klarheit zu schaffen, bleibt der künftigen Forschung vorbehalten.

Im Diskussionsteil wird die Frage der Verwandtschaft des Stolburs mit einigen anderen Virosen behandelt. In der vorliegenden Arbeit werden besonders „spindle tuber“ und „Gotik“ erörtert (mit „witches broom“ und anderen befasste sich die Arbeit von Brčák, Blatný, Pozděna, 1955). Die Ätiologie dieser Krankheiten ist unklar, die Symptomatik unvollendet, die Frage der Vektoren zweifelhaft.

Abschliessend werden die Richtlinien für die Bekämpfung des Stolburs ergänzt. Neben Bekämpfung von Ackerwinde und Vektoren wird die Verwendung vorgekeimter Knollen von frühreifenden Sorten empfohlen. Werden die Kartoffeln solcher Sorten vom Stolbur befallen, so geschieht dies im Hinblick auf die Frühreife der Sorten erst am Schluss der Vegetation, sodass diese nicht mehr bedroht sind. Knollen mit Fadenkeimen sind auszuschneiden, das Kartoffelpflanzgut nur aus jenen Gebieten zu beziehen, in welchen der Stolbur nicht vorkommt. In typischen Stolburgebieten soll dies womöglich alljährlich geschehen, schon aus dem Grunde, weil durch die Stolburerkrankung der Mutterpflanzen der Ertrag der Tochterpflanzen in jedem Falle stark vermindert wird.

Краткие сообщения

Brief Reports

Kurze Mitteilungen

К проблематике бактериального миколиза

Я. АРПАИ и О. ЯНОТКОВА

Масса мицелия пенициллии (*Pen. chrysogenum*), полученная как отход при лабораторной ферментации пенициллина, в одном случае расплылась при таких условиях, при которых исключалась возможность автолиза, так что возникло предположение, что это явление вызывалось микробным разложением оболочек мицелия, состоящих по существу из целлюлозы и хитина. В литературе было найдено подобное сообщение Н. М. Авдиевича в журнале Микробиология XX : 38, 1953. Эта работа служила нам методологическим руководством, а также для сравнения ее с нашими результатами в рамках дискуссии.

Наши опыты были начаты с посева расплывшейся массы мицелия на мясопептонный агар (МПА) и желатин (МПЖ), на картофельный агар (КА) и желатин (КЖ), на среду с агаром и кукурузным экстрактом (КЭА) и на сыровоточный агар (СА). На растительных средах, в особенности на КА и на КЖ, выростала аэробная микрофлора, интересная тем, что в центральной части колоний она углублялась в агар. Это бывали мелкие (2—3 мм), круглые колонии, желтовато-белого цвета, с цельными венцеобразными краями. На мясных средах колонии этой формы не наблюдались. Здесь были отмечены крупные, круглые колонии, с зернистым и даже ножистым налетом грязнобелого цвета, которые после более чем недельной культивации на МПА также несколько углублялись в агар. На немясных средах можно было наблюдать, как вышеописанные бактериальные образования препятствовали росту пенициллий в своем окружении. Споры вокруг колоний также не прорастали. Микроскопические наблюдения показали, что, — как на мясных, так и на немясных средах, — исследуемые колонии микробов образуются смесью палочек, отличающихся друг от друга по форме. Характерным отличительным признаком для них был способ движения, который у грамположительных (грам⁺) спорообразующих палочек бывал обусловлен движением жгутиков, тогда как вторая, грам-отрицательная (грам⁻) и не образующая спор часть микрофлоры, делившаяся путем почкования и перешнуровки, двигалась с помощью своего рода переливания, т. е. реактивно. На мясных средах преобладала микрофлора грам⁺, на немясных — грам⁻.

Исходя из предположения, что миколиз вызывается миксобактериями с симбиотической микрофлорой, мы произвели их размножение на элективной среде по Омелянскому, причем наблюдалась скорость роста в этой среде и в этой же среде с прибавлением отвара помета. Производился количественный учет нарастания поверхности маленькой бумажной пирамиды. Было установлено, что смесь бактерий активнее, чем чистая культура миксобактерий, изолированная при помощи метода качалки. Равным образом при испытаниях миколитической активности, которые производились путем накладки бумажных кружков, засеянных взвесью бактерий, на культуры пенициллиума, было установлено, что смесь бактерий в своем первоначальном составе вызывает более интенсивный миколиз, чем чистая культура. Было произведено также испытание чувствительности к пенициллину в концентрации 10 ед. на 1 мл. Чистая культура отличалась устойчивостью, у исходной микрофлоры наблюдался разреженный рост, а рост отделившейся от нее сопровождающей микрофлоры подавлялся.

Для характеристики изолированной чистой культуры можно привести, что палочки, значительно менявшие форму в зависимости от условий среды, бывали грам⁻, размерами большей частью 2,0—3,7 μ : 0,7—0,9 μ слизистые на поверхности; не образовали спор и размножались делением. Во многих клетках бывало хорошо видимое ядерное тельце; они двигались задним, ходом, характеристическими толчками. Образование плодовых тел и цист не наблюдалось. В качестве культивационного признака колоний можно привести круглую форму с цельными венцеобразными, слегка дольчатыми краями, желтовато-белого цвета; колонии постепенно становились слизистыми и углублялись в агар. Желатин они превращали в жидкость, а крахмал подвергали гидролизу. Микрофлора имела аэробный характер. На мясных средах рост не наблюдался. На основании вышеприведенных признаков была определена принадлежность этих палочек к миксобактериям. Спорообразующие палочки, отделившиеся путем кипячения, дали характерные признаки, на основании которых они были определены как *Vac. subtilis*; он и преобладал в сопровождающей микрофлоре. Условия опыта не исключают возможности присутствия и других видов бацилл.

В дискуссии эти наблюдения сопоставляются с выводами Н. М. Авдиевича, причем отмечаются некоторые различия в вопросе образования плодовых тел и цист у представителей рода *Sorangium*, а также количественная разница в биохимической активности, проявляющаяся в степени превращения агара в жидкость и в способности разлагать различные виды клетчатки. Факт, что изолированная авторами микрофлора отличалась значительной миколитической способностью, но при этом лишь незначительно разрушала на поверхности фильтровальную бумагу, привел авторов к предположению, что дело здесь в гидролизе хитина, благодаря которому происходит разложение мицелия. Однако специфическое действие на хитин не было экспериментально доказано, так что только в форме дедукции можно предполагать принадлежность изолированной культуры к промиксобактериям.

Центр тяжести работы заключался не в идентификации и системизации палочек, а в определении симбиотических влияний на процессы жизнедеятельности миксобактерий, в результате которых повышалась их миколитическая деятельность, что могло бы открыть пути к получению фунгистатического антибиотика. При этом масса мицелия из отходов производства пенициллина могла бы служить в качестве основы ферментационной среды.

M. Hejtmánek and N. Hejtmánková-Uhrová: Unusual Forms of Variability in Trichophyton mentagrophytes Plate XV. mentagrophytes.

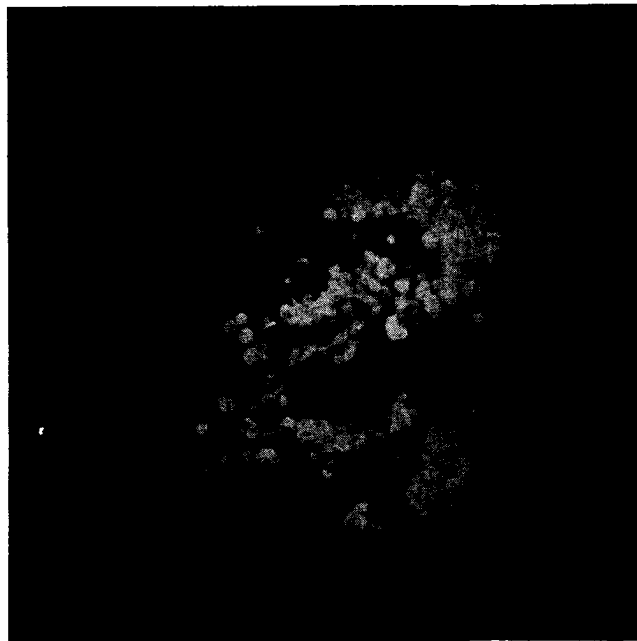
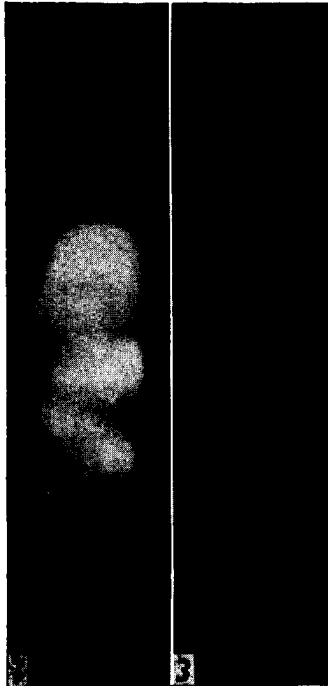


Fig. 1. Normal woolly culture of *Trichophyton mentagrophytes* (A). Age: 15 days, Sabourand medium with glucose SGA, natural size.

Fig. 2. Dried-up colony of subculture B with coremia growing out from the surface. Age: 2 months, SGA, magnification 1.5 \times .

Fig. 3. Colony of substrate mycelium of subculture C₁. Age: one month, SGA, natural size.

Fig. 5. Colony growing from coremia. Subculture C₂ Age 75 days, SGA, Substrate mycelium (periphery) turning into finely granular heaps of short, cotton-like mycelium. Magnification 3 \times .

M. Hejtmánek and N. Hejtmánková-Uhrová: Unusual Forms of Variability in Trichophyton Plate XVI, mentagrophytes.

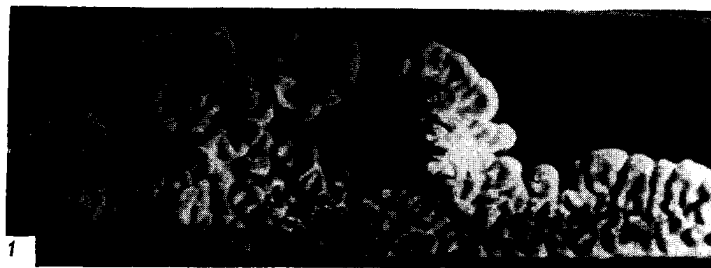
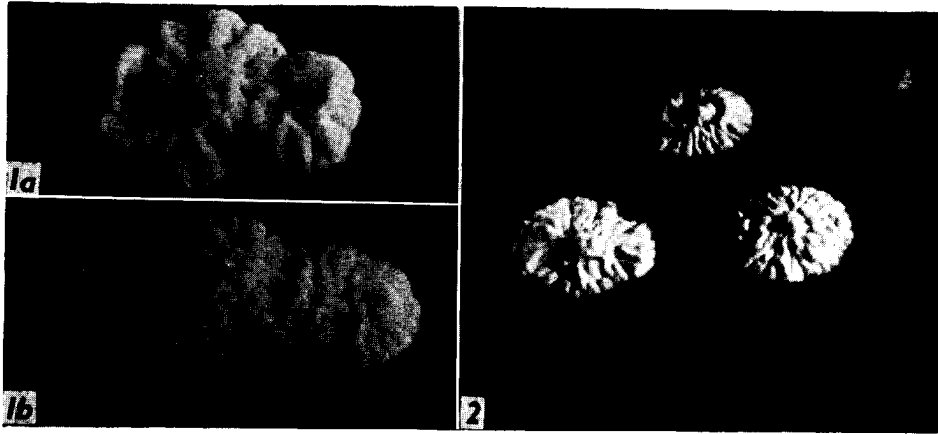


Fig. 1a, b. Waxy faviform colony of G₄. SGA, 12 days, magnification 2 ×.

Fig. 2. Granular faviform colony of G₄. SGA, 4 weeks, natural size.

Fig. 6. Development of coremia without reinoculation in subculture D₁. Age 107 days, SGA, natural size. Agar plate dried up and cracked.

Fig. 7. First phase of development of heap into coremia. Subculture D₁. Age 38 days, SGA, magnification 2 ×. Agar plate dried up and cracked.

Fig. 10. Cerebriform colony of subculture F₃. In centre, on original inoculum, very short coremia growing. Age: 34 days, SGA, magnification 2 ×.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

C O N T E N T S

I N H A L T

Штерцль, Я.: Длительная иммунизация. Изменения в образовании антител, в лейкоцитарной и температурной реакции (Šterzl, J.: Long-term Immunisation. Changes in Antibody Formation and Leucocytic and Pyrexial Reactions)	129
Йогановский, Ю.: Состояние невосприимчивости в течение экспериментальной стафилококковой инфекции (Johanovský, J.: The Phenomenon of Resistance in the Course of Experimental Staphylococcal Infection)	141
Hejtmánek, H., Hejtmánková-Uhrová, N.: Unusual Forms of Variability in Trichophyton mentagrophytes (Гейтманек, М. и Гейтманкова-Угрова, Н.: Необычные формы изменчивости Trichophyton mentagrophytes)	149
Хутная, И.: Изучение заживления раны в денервированной конечности (Chutná, J.: A Study of Wound Healing in a Denervated Extremity)	157
Hraba, T.: Immunological Behaviour of Embryonal Parabionts between Turkey and Hen (Граба, Т.: Иммунологическое поведение эмбриональных парабионтов между индюшкой и курицей)	165
Erhardová, B., Ryšavý, B.: Zur Frage der quantitativen koprologischen Untersuchungsmethoden in der Helminthologie (Эргардова, Б., Рышавый, Б.: К вопросу количественных копрологических методов исследования в гельминтологии)	172
Блатный, Ц., Брчак, Я., Лимберк, Я., Бойнянский, В.: К вопросу эпидемиологии столбура в ЧСР, в особенности столбура картофеля (Blatný, C., Brčák, J., Limberk, J., Bojnanský, V.: Beitrag zur Stolbur-Epidemiologie in der ČSR unter besonderer Berücksichtigung der Kartoffeln)	181
Краткие сообщения	191