

VĚDECKÝ ČASOPIS

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

5

ROČNÍK 16 (XLIV)
PRAHA
KVĚTEN 1971
CENA 10 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Řídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král (předseda), prof. MVDr. Kolo-
man Boďa, DrSc., doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr.
Jaroslav Dražan, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., MVDr.
Miloš Halaša, CSc., prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc., doc.
MVDr. Jozef Hrušovský, CSc., MVDr. Jaromír Lát, MVDr.
Andrej Mačička, CSc., doc. MVDr. Ladislav Polák, CSc.,
MVDr. Jiří Srna, prof. MVDr. Jaroslav Vrtiak, DrSc.

Vedoucí redaktorka ing. Jovanka Václavíčková

© Ústav vědeckotechnických informací, Praha 1971

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje stu-
die, rozborů a vědecká pojednání o vyřešených úkolech vý-
zkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav vědecko-
technických informací. Vychází měsíčně. Redakce: Praha 2,
Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné Kčs 120,—.

Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзо-
ры, анализы и научные статьи о разрешенных задачах по научному
исследованию в области ветеринарии. Издаёт Институт научно-
технической информации. Выход в свет ежемесячно. Редакция
Прага 2, Слезска 7.

The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publishes
studies, analyses and scientific treatises about the solved
research tasks in the line of the veterinary medicine. Pu-
blished by the Institute of Scientific and Technical Informa-
tion. Issued monthly. Editorial office Prague 2, Slezská 7.

Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Ab-
handlungen über die gelösten Forschungsaufgaben auf dem
Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben von Institut
für wissenschaftlich-technische Informationen. Ercheint mo-
natlich. Redaktion Praha 2, Slezská 7.

Le journal scientifique VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publie
les études, analyses et traités scientifiques concernant les
tâches de recherches résous dans le domaine de médecine
vétérinaire. Publie par l'Institut des renseignements scienti-
fiques et techniques. Paraît une fois par mois. Rédaction
Prague 2, Slezská 7.

PŘÍPAD TUMORÓZNÍ LYMFATICKÉ LEUKÓZY SKOTU S NEOBYČEJNĚ VYSOKÝM POČTEM LEUKOCYTŮ

J. Komárek, J. Dvořák

Státní veterinární ústav, Pardubice
Parasitologický ústav ČSAV, Praha

KOMÁREK J., DVOŘÁK J. Případ tumorózní lymfatické leukózy skotu s neobvykle vysokým počtem leukocytů. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 281-284, 1971.

Je popsán případ tumorózní lymfatické leukózy u krávy kříženky s neobvykle vysokým počtem leukocytů (700–800 tisíc v 1 mml). V hojném počtu byly nalezeny buňky lymforetikulárního charakteru, značně polymorfní, různé velikosti a se změnami jaderného chromatinu. Nálezy v periferní krvi odpovídaly nálezům v kostní dřeni a v mízních uzlinách. Pitvou byly zjištěny změny odpovídající lymfatické leukóze, tj. zvětšení mízních uzlin, abnormálně zvětšená slezina a játra. Histologickým vyšetřením byl nález potvrzen.

kráva kříženka; lymforetikulární buňky; 700–800 000 leukocytů v 1 mml; polymorfnost; mladé buňky; patologicko-anatomické a histologické potvrzení

Dosavadní literární údaje o leukóze skotu referují o vysokých počtech leukocytů při formě tumorózní i subklinické. Bendixen (1963) zjistil při tumorózní formě 50–100 tisíc leukocytů v 1 ml a ojediněle až 200–500 tisíc v 1 mml. Převažovaly lymfocyty, jejichž podíl z celkového počtu byl 95–100 %. Ueberschär (1963) zjistil v jednom případě leukózy 160 tisíc leukocytů v 1 mml s 97 % podílem lymfocytů. Winqvist (1961) jich pozoroval v šesti případech leukózy více než 100 tisíc v 1 mml. I tu ve shodě s předcházejícími nálezy byly v převaze lymfocyty a buňky lymforetikulárního charakteru. Montemagno (1963) nacházel v periferním krevním obraze rovněž zejména lymfocyty, jichž bylo v konečné fázi až 92 % a většinou šlo o atypické lymfocyty. V adenogramu nalézal velké množství buněk lymfatického charakteru, mnohé z nich ve formě Gumprechtových stínů s výskytem sférických inkluzí v cytoplasmě. Natčev a Pejnikova (1960) zjistili při klinické formě u telete přes 120 tisíc leukocytů v 1 mml, z toho byly 92–98 % lymfocytů.

VLASTNÍ PRÁCE

V srpnu 1970 byla přivezena k léčení kráva kříženka z jednoho JZD s diagnózou *reticuloperitonitis traumatica acuta*. Při zjišťování celkového počtu leukocytů v periferní krvi bylo zjištěno, že síť Bürkerovy komůrky je poseta leukocyty (obr. 1, 2).

V jednom čtverci Bürkerovy komůrky, kde obvyklý nález je jeden až dva leukocyty, bylo jich zjištěno 150 až 160, což při přepočtu odpovídá celkovému počtu 750 až 800 leukocytů v 1 mml.

Podrobné klinické vyšetření ukázalo, že všechny tělové mizní uzliny (praescapulární, popliteální, supramamární apod.) jsou značně zvětšeny. Kráva byla sledována klinicky a hematologicky po dobu tří týdnů a během této doby bylo zaznamenáno zhoršování klinického stavu a snižování tělesné váhy (20. 8. — 440 kg, 3. 9. — 410 kg, 14. 9. 400 kg). Chuť k přijímání potravy byla po celou dobu zachována. Průběžně byl sledován periferní krevní obraz (tabulka I).

I. Periferní krevní obraz

Dne	Erytrocyty	Leukocyty	Hemoglobin	Sedimentace	Diferenciál
17. 8.	5,200000	800000	52	5, 15, 27, 87	převládají buňky lymfo- retikulárního charakteru
24. 8.	5,960000	750000	50	5, 10, 20, 77	
31. 8.	5,900000	760000	50	3, 15, 19, 67	
2. 9.	6,400000	810000	50	5, 10, 23, 75	
9. 9.	5,000000	740000	29	3, 8, 19, 71	
14. 9.	4,020000	700000	39	1, 6, 15, 77	

Počty erytrocytů a leukocytů jsou udávány v 1 mml, hemoglobin ve stupních Sahli, sedimentace šikmá při 60° za 30, 60, 120 min a 24 hod.

Dynamika periferního krevního obrazu, jak je zřejmé z tabulky I, vykazuje prohlubování poklesu v červené krevní řadě, který korespondoval s prohlubováním celkového klinického i výživného stavu. Počet leukocytů nebyl stálý, v konečné fázi onemocnění docházelo k poklesu.

Morfologická rozmanitost jednotlivých buněčných elementů s naprostou převahou buněk lymforetikulárního charakteru je zřejmá z obrázků 3, 4 a 5.

Kostní dřev se zjišťovala kostní punkcí v místě dorzálního výběžku desátého žebra sternální jehlou po místním znecitlivění, nátěr kostní dřevě byl obarven panopticky. Nálezy v kostní dřevě byly podobné jako v periferní krvi a bylo zjištěno: 2,4 % buněk červené řady, 0,4 % myelocytů, 0,4 % metamyelocytů, 0,8 % tyčů, 1,2 % segmentů, 0,4 % eozinofilů, 0,4 % plazmatických buněk a 94 % mladých lymforetikulárních buněk.

Převaha mladých lymforetikulárních buněk je patrná z obrázku 6.

Adenogram byl vyšetřován po punkci popliteální mizní uzliny. Panoptické barvení prokázalo, že tak jako v periferní krvi a kostní dřevě, i v mizních uzlinách převládají mladé lymforetikulární buňky, jak je zřejmé z obrázku 7.

Při sledování klinického stavu byly zjišťovány i hodnoty transamináz a u obou (GOT, GPT) byly zjištěny postupně se zvyšující hodnoty:

	GOT	GPT
20. 8.	7,0	1,16
31. 8.	10,0	1,20
3. 9.	9,4	0,74

Hodnoty transamináz jsou udány v mikromolech a z výsledků je patrné, že zhoršování klinického stavu bylo provázáno postupnými změnami jaterního parenchymu.

Pitvou krávy bylo zjištěno výrazné zvětšení všech mizních uzlin, abnormálně zvětšená slezina (asi 15 kg), zvětšená játra a výrazná dilatace srdce. Histologicky byla potvrzena leukóza (lymfatického charakteru).

DISKUSE

Popsaný případ tumorózní lymfatické leukózy skotu svým počtem leukocytů v periferní krvi (700—800 tisíc v 1 mm³) přesahuje počty dosud popsaných případů. Je možné, že onemocnění bylo zachyceno ve fázi, kdy docházelo k maximálnímu vyplavování leukocytů do periferie. Morfologické změny charakterizované převážně mladými buňkami lymforetikulárního charakteru jsou obdobné těm, které byly popsány jinými autory. Změny v kostní dřeni se poněkud liší od nálezů Winquista (1961). Naproti tomu nálezy v adenogramu jsou shodné s tím, co popsal Montemagno (1963) — Gumprechtovy stíny a sférické buňky.

Mikrofotografie zhotovil p. Čáp z Výzkumného ústavu pro farmacii a biochemii v Praze.

Technická spolupráce: B. Krumlová, I. Kynclová, B. Jadrná.

Literatura

- BENDIXEN H. J., 1963, Leukosis enzootica bovis — Diagnostik, epidemiologi, be-
kaempelse. Kobenhaven.
MONTMAGNO F., 1963, Transmissibilita in serie della leucosi linfatica sperimen-
tale dei bovini. Acta Medica Veterinaria 3-4 : 151-158.
NATCEV B., PEJNIKOVA T., 1960, Über die ersten Fälle von Rinderleukose in
Bulgarien. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 19 : 369.
THEILEN G. H., DUNGWORTH H., 1965, Bovine lymphosarcoma in California.
Part III. The calf form. American Journal of Veterinary Research 26 : 696-709.
UEBERSCHÄR S., 1963, Elektronenoptische Untersuchungen an den Zellen der tu-
morösen Form der Leukose des Rindes. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift
15/16 : 417-422.
WINKUIST G., 1961, Die Hämatologie der Rinderleukose. Tagungsberichte 49 : 23-32.

Došlo dne 13. 11. 1970

КОМАРЕК Й., ДВОРЖАК Й. (Государственный ветеринарный институт, Пардубице; Па-
разитологический институт ЧСАН, Прага, Чехословакия). Случай опухолевого лимфати-
ческого лейкоза крупного рогатого скота с необычно большим количеством лейкоцитов.
Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 281-284, 1971.

Описан случай опухолевого лимфатического лейкоза у помесной коровы с необычайно боль-
шим количеством лейкоцитов (700—800 тыс./мм³). Обнаружены многочисленные клетки
лимфоретикулярного характера, значительно полиморфные, разной величины и с изме-
нениями ядерного хроматина. Диагноз периферийной крови отвечал диагнозам костного
мозга и межпозвоночным узлам. Вскрытие показало изменения, отвечающие лимфатичес-
кому лейкозу, т. е. укрупнение межпозвоночных узлов, абnormally увеличенные селезенки
и печень. Гистологическое исследование диагнозов подтвердило.

помесная корова; лимфоретикулярные клетки; 700—800 лейкоцитов/мм³; полиморфия; мо-
лодые клетки; патолого-анатомическое и гистологическое подтверждение

KOMÁREK J., DVORÁK J. (State Veterinary Institute, Pardubice, Parasitological
Institute of Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, Czechoslovakia). A Case of
Tumorous Bovine Lymphatic Leucosis with an Extraordinarily High Number of
Leucocytes. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 281-284, 1971.

A case of tumorous bovine lymphatic leucosis is described in a crossbred cow hav-

ing an extraordinarily high number of leucocytes (700—800 thousand per mml). Cells of lymphoreticular nature, considerably polymorphous, of different sizes and with changes in nuclear chromatin, were found in excessive quantities. The findings in peripheral blood corresponded to those in lymph nodes. Dissection revealed changes accompanying lymphatic leucosis, i. e. enlarged lymph nodes, abnormally enlarged spleen and liver. Histological examination corroborated the findings.

crossbred cow; lymphoreticular cells; 700—800 thousand leucocytes in 1 mml; polymorphism; young cells; pathological-anatomical and histological proof

KOMÁREK J., DVOŘÁK J. (Staatliches Veterinärinstitut, Pardubice, Parasitologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha, Tschechoslowakei). *Ein Fall der tumorösen lymphatischen Leukose des Rindes mit einer ungewöhnlich hohen Leukozytenanzahl*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 281-284, 1971.

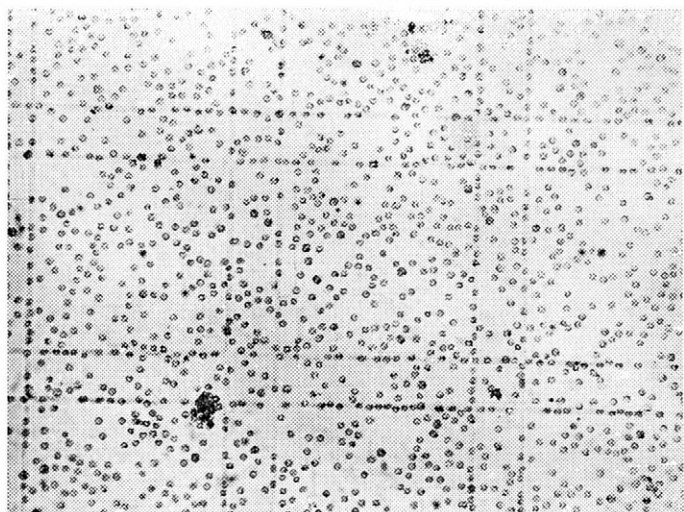
Es ist der Fall einer tumorösen lymphatischen Leukose bei einer Kreuzungskuh mit einer ungewöhnlich hohen Leukozytenanzahl (700—800 Tausend in 1 mml) beschrieben worden. Es sind häufig Zellen von einem lymphoretikulären Charakter, ziemlich polymorph, von verschiedener Größe und mit Änderungen des Kernchromatins festgestellt worden. Befunde im Peripheralblut entsprechen den Befunden im Knochenmark und den Lymphknoten. Durch Sezierung sind die der lymphatischen Leukose, d. h. Vergrößerung der Lymphknoten, abnormal vergrößerten Milz und Leber, entsprechenden Änderungen ermittelt worden. Durch histologische Untersuchung ist der Befund bestätigt worden.

Kreuzungskuh; lymphoretikuläre Zellen; 700—800 000 Leukozyten in 1 mml; Polymorphie; junge Zellen; pathologisch-anatomische und histologische Bestätigung

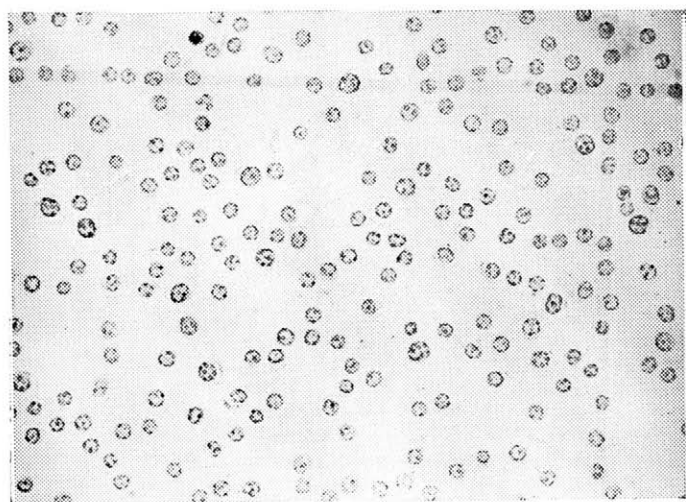
Adresy autorů:

MVDr. J. Komárek, Státní veterinární ústav, Pardubice,

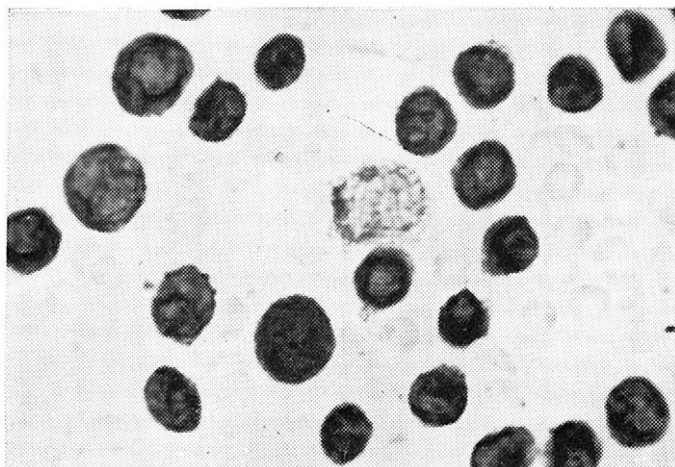
MUDr. J. Dvořák, DrSc., Parazitologický ústav ČSAV, Praha 2, Flemingovo n. 2



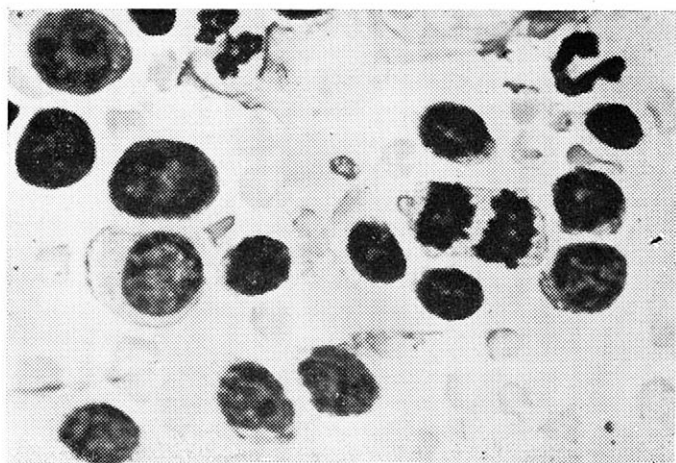
1. Síť Bürkerovy komůrky, posetá leukocyty



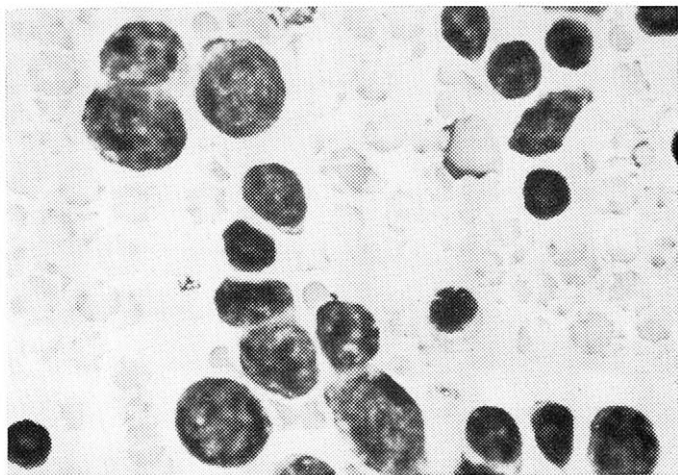
2. Jeden čtverec Bürkerovy komůrky, naplněný velkým množstvím leukocytů



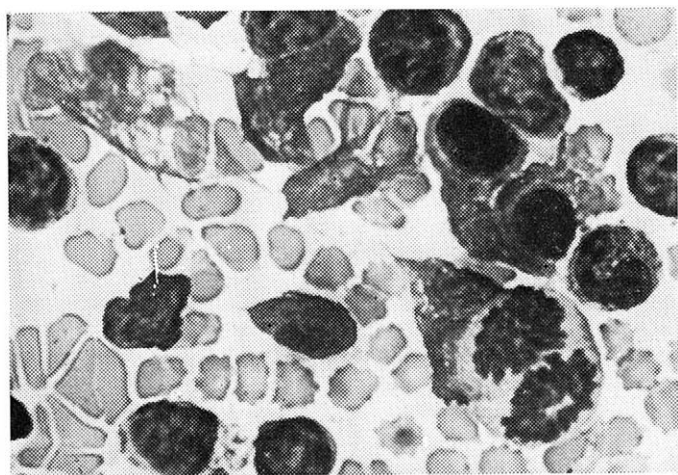
3. Buňky lymforetikulárního charakteru s nepravidelným tvarem, výskyt mitózy, erytroblast



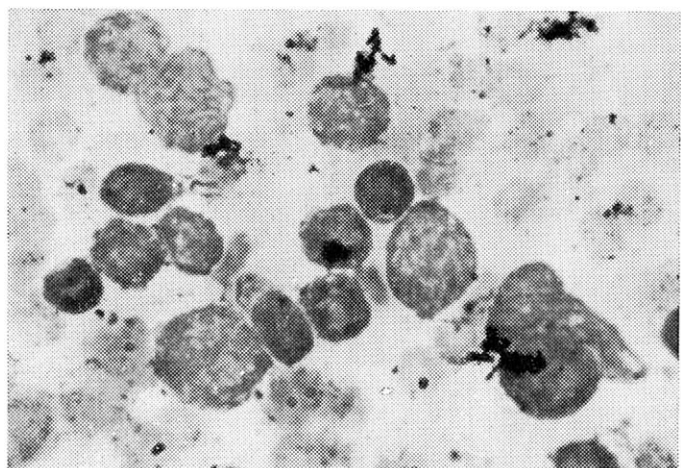
4. Značná mnohotvárnost lymforetikulárních buněk, výskyt mitózy, buňky s nepravidelným tvarem a excentricky uloženým jádrem



5. Buňka v mitóze, Gumprechtův stín, mladá buňka myeloidní řady, erytroblast



6. Mladé lymforetikulární buňky, velká mitóza, proerytroblasty, eosinofilní tyč, Gumprechtovy stíny, tvarové změny jader



7. Mladé lymforetikulární buňky s řidší jadernou strukturou

VLIV VYSOKÝCH DÁVEK MOČOVINY NA ZDRAVOTNÍ STAV TELAT

J. Šrámek

Výzkumný ústav pro chov skotu, Rapotín

ŠRÁMEK J. *Vliv vysokých dávek močoviny na zdravotní stav telat.* Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 285-294, 1971.

Při výzkumu využití různých zdrojů N-látek časně odstavenými telaty byla zkoumána otázka, zda se vysoké dávky močoviny neprojeví toxicky. Od průměrného stáří telat 44,33 dne, kdy vážila v průměru 61,06 kg, byla zkrmována krmná směs pro časný odstav telat s obsahem 3 % močoviny. První týden zkrmování dosáhla spotřeba močoviny 34,4 g, což představovalo 36,34 g na 100 kg živé váhy. Spotřeba močoviny byla maximální ve třetím týdnu zkrmování, kdy dosáhla hodnoty 76,39 g na 100 kg živé váhy. Tři hodiny po předložení krmné dávky byly zjištěny vysoké hodnoty čpavkového N v bachorové tekutině. Podstatně se zvýšila také úroveň močoviny v krevním séru. Jadrný typ krmné dávky měl za následek velmi intenzivní fermentační pochody v bachoru s nízkou koncentrací vodíkových iontů ($\text{pH} = 5,43$) a zkrmování močoviny ji významně neovlivnilo. Příznaky akutní toxikace močovinou nebyly pozorovány ani v průběhu tří týdnů po zahájení pokusu. Histologické nálezy na játrech a ledvinách však nevyklučují škodlivý vliv zkrmování močoviny na zdravotní stav telat. Pokus prokázal, že časně odstavená telata vykazují ruminální činnost na vysoké úrovni a že použití močoviny v krmných dávkách je možné.

toxikace; časný odstav; toxicita močoviny

Cílem pokusu, jehož výsledky předkládáme, bylo doplnit základní krmnou směs pro časný odstav telat složenou z obilovin a mlýnských výrobků močovinou tak, aby obsahovala potřebné množství N-látek (20–22 %) v poměru ke škrobovým jednotkám 1 : 4 a sledovat, zda potřebné dávky močoviny nevyvolají u telat ve stáří od šesti týdnů a o váze kolem 60 kg toxické účinky. Problém byl řešen v souborném výzkumu využití různých zdrojů dusíkatých látek telaty po odstavu.

V literatuře je popisována dvojí forma toxikace močovinou; akutní a chronická. Syndromem akutní toxikace je nejčastěji označována ataxie (někdy se ztrnulým vzezřením — Fraser 1963), ruminální stagnace, nadmutí, nadměrné vylučování slin, zvýšená hloubka a rychlost dechu, tetanie, zhroucení, regurgitace a uhynutí (Bullington a kol. 1955, Pieterse a de Kock 1962, Fraser 1963 a další). Dinning a kol. (1948) u volků, stejně jako Pierson a Aanes (1959) pozorovali však dýchání pomalé a hluboké, popřípadě obtížné. Szabovics (1962) uvádí, že skot otrávený močovinou vykazoval syndrom podobný otravě strychninem, tj. téměř okamžitou ruminální stagnaci, nadmutí, nadměrné vylučování slin, regurgitaci a smrt.

Názory na chronickou otravu nejsou tak jednoznačné. Hart a kol. (1939,

cit. Austin 1967) poukazoval na to, že mladý skot vykazoval po 12 měsících diety s močovinou různé patologické stavy. 2 % močoviny v krmné dávce vedla k slabému poškození ledvin, 4,3 % močoviny v krmné dávce měla za následek diuresis a hypertrofii ledvin. Byly pozorovány také nekrotické plochy v játrech. Hübner a kol. (1966) našel u dojnic zánětlivá podráždění intersticia obou ledvin. Work a kol. (1943) u skotu a Harris a Mitchell (1941) u ovcí (oba cit. Austin 1967) neshledali poškození ledvin. Austin (1967) našel patologické stavy orgánů v souvislosti s obsáhlou postmortální analýzou, která ukázala zhroucení krevního oběhu, subendo- a epokardiální krvácení, ale také poškození jater a ledvin s tukovou degenerací.

Výzkumníci vyslovili nejdříve názor, že čpavek nadměrně produkovaný rychlou hydrolýzou močoviny je příčinou její toxicity. Názor, že toxicita močoviny je synonymní s toxicitou čpavku, zastává většina. Akutní toxicita čpavku byla také demonstrována injikováním ureázy králíkovi (Baldwin 1957, cit. Austin 1967), který uhynul, když čpavek v krvi dosáhl 5 mg%. Clark a kol. (1951, cit. Stangell 1967) poukázal na to, že infúze čpavku po proudu krve nevyvolává symptom typický pro intoxikaci močovinou. Hale a King (1955, cit. Stangel 1967) považovali na základě své práce za příčinu toxicity močoviny spíš karbaminan amonný než čpavek. Jak perorální, tak intravenózní aplikací karbaminu amonného ($\text{NH}_2 \cdot \text{COO} \cdot \text{NH}_4$) vyvolali symptom podobný intoxikaci močovinou a experimentálně prokázali, že tělo postrádá enzym rozkládající tuto sloučeninu. Dále vyslovili názor, že karbaminan amonný lze získat neúplnou hydrolýzou močoviny, nebo může vznikat v podmínkách existujících v bachoru při zkrmení vysokých dávek močoviny, tj. za přítomnosti velkého množství čpavku a kysličníku uhličitého.

Head a Rook (1955, 1957) uvádějí v korelaci vysokou hladinu bachorového čpavku s nepřiměřenou intestinální absorpcí Mg. Také Voisin (1963) připouští jako jednu z příčin hypomagnézie vysoce bílkovinný jarní pastevní porost; jeho zkrmování vede ke vzniku nadměrného množství čpavku v bachorové tekutině. Ale i tyto práce jsou v rozporu s pracemi jiných autorů. Warren (1962) se zmiňuje o tom, že intoxikace čpavkem by mohla být v korelaci s deficiencí nikoliv Mg, nýbrž K. Je tedy patrné, že není možné ještě dnes s určitostí definovat princip toxického účinku močoviny, ale je jistě v souvislosti s vývojem čpavku jako přímého nebo nepřímého činitele a jeho prostupem bachorovou stěnou do krevního oběhu.

V souvislosti s prostupem čpavku bachorovou stěnou a také z praktického hlediska jsou velmi významné poznatky o vlivu koncentrace vodíkových iontů. Ukázalo se, že prostup čpavku bachorovou stěnou závisí nejen na koncentraci čpavku, nýbrž i na pH bachorové tekutiny. Coombe a kol. (1960) a Warren (1962) poukazují na to, že čpavek je nejvíce toxický za podmínek vysokého pH, kdy se vytváří neionizovaná forma NH_3 , pro kterou je většina membrán prostupnější než pro ion amonia NH_4^+ , vznikajícího při nízkém pH. Gärtner (1963) dodává, že propustnost bachorové stěny pro čpavek je zvyšována přítomností močoviny na intersticiální straně membrány. Coombe a kol. (1960) v této souvislosti zjistil, že přežvykování skončilo, když pH vystoupilo na 7,2.

Yoshida a Nakamura (1963) rovněž zjistili, že absorpce čpavku z bachoru do krve s paralelní toxicitou močoviny u kozy byla zvýšena vysokým pH bachorové tekutiny. Z tohoto principu je konečně odvozeno použití slabých kyselin (octu) jako perorálně podávaných protidávek při otravě močovinou.

Rozhodující význam pro vznik otravy má množství zkrmované močoviny,

kteřé však podle souhrnné práce Austina (1967) je velmi variabilní. Zde je možné sledovat rozpětí od 44 g/100 kg živé váhy jako hranice pro výskyt akutní toxicity až po 88 g/100 kg živé váhy, popřípadě 400 až 600 g na dospělé zvíře, které nepůsobí škodlivé účinky.

Podle Stangela (1967) je vysoká variabilita množství močoviny, způsobilého vyvolat toxikaci, závislá především na úrovni toxicity pro určité zvíře, na množství a druhu uhlohydrátů a bílkovin v krmné dávce, popřípadě na způsobu zkrmování. V praktických návodech na zkrmování močoviny skotu se nejčastěji setkáváme s hodnotami kolem 3 % močoviny z celkové krmné dávky, které je možno považovat za bezpečné (Lízal a Opletalová 1962, Mason 1967, Studt 1968 a další). Uvedená množství močoviny vyplynula vesměs z experimentálních prací i praktického použití o možných dávkách močoviny pro telata po odstavu, resp. po časném odstavu. I Piatkowski (1966), který zkrmoval močovinu telatům, uvádí výsledky teprve ve stáří 19 až 21 týdnů.

MATERIÁL A METODY

K pokusům jsme použili telat českého červenostrakatého skotu. Při jejich odchovu od 7 do 10 dnů stáří, kdy byla ustájena a individuálně sledována v experimentálních podmínkách, byly dodržovány zásadní podmínky krmení časného odstavu, tj. omezené dávky mléka (do 12 % živé váhy při nákupu, při dvojím napájení denně), volný přístup ke krmné směsi a k pitné vodě a jednotné ustájení i ošetřování. Po dobu zkrmování tekuté mléčné náhražky, připravené z Laktosanu ředěním vodou v poměru 1 : 9, byla telatům předkládána základní krmná směs složená ze 43,8 % ječmene, 29,9 % ovsa, 16 % pšenice, 8,8 % pšeničných otrub, 1,5 % MKP III (minerální krmné přísady) a 0,7 % krmné soli (12,28 % N-látek v sušině). Po odstavu, který byl uskutečněn hned, jakmile telata zkonzumovala dostatečné množství krmné směsi, byla tato směs obohacena o 3 % močoviny (22,70 % N-látek v sušině) a byl zahájen vlastní experiment. Močovina byla zkrmována celkem u 46 telat. U 21 telete byla močovina zkrmována až do stáří 177 dní (stejně početná byla i skupina kontrolní), zatímco u ostatních bylo zkrmování močoviny ukončeno ve stáří 91, resp. 98 dní a dále byla použita k jiným účelům.

Krmnou dávku po zahájení pokusu tvořila pouze krmná směs a pitná voda nadále podávaná v neomezovaných dávkách. Teprve od stáří osmi týdnů byla zařazena do krmných dávek také senáž, jejíž konzum byl usměrňován a postupně se zvyšoval. Od 10 týdnů stáří byla regulována spotřeba krmné směsi a *ad libitum* byla předkládána pouze senáž a pitná voda. Podíl močoviny v krmné směsi byl stejný po celou dobu trvání pokusu. Změna absolutního množství zkrmené močoviny byla v souvislosti s dávkováním jaderného krmiva, které vyplývalo z potřeby živin a z objemu trávicího traktu, měřeného denní spotřebou sušiny v odpovídajícím vývojovém stadiu. Hlavní pozornost musela být soustředěna především na období pěti týdnů po zahájení pokusu; v této době byla směs jaderného krmiva výhradním nebo převážným krmivem a absolutní a relativní spotřeba močoviny byla analogicky nejvyšší. Kromě toho jsme očekávali reakci organismu na náhlé zařazení močoviny do diety.

Zdravotní stav byl posuzován především podle vzhledu a chování zvířat se zřetelem k symptomu intoxikace močovinou. Zvířata jsme sledovali denně. Prvních pět dní od začátku pokusu byla telata tři hodiny po nakrmení pod stálým dohledem.

Dále jsme sledovali koncentraci vodíkových iontů a čpavku v bachorové tekutině, kterou jsme odebírali jícnovou sondou za podtlaku 0,5 atmosféry. Při odběru jsme vyloučili vzorky se zřetelným obsahem slin a dbali jsme na to, aby sonda byla zavedena nejvýše dvakrát při jednom odběru. Ke stanovení pH pomocí pH-metru byl vzorek odebírán do zvláštní nádoby pod vrstvu parafinového oleje. Čpavek byl stanoven metodou podle Conwaye. Krev po stanovení močoviny byla odebírána z *vena jugularis*. Močovina byla stanovena rovněž podle Conwaye. Pro odběr bachorové tekutiny a krve jsme zvolili intervaly 3, 6 a 12 hodin po podání krmné dávky a do stáří tří měsíců jsme tato stanovení třikrát opakovali.

Vedle těchto ukazatelů úzce souvisejících s metabolismem močoviny jsme sledovali počet červených a bílých krvinek, hemoglobin, leukogram a nárazníkovou kapacitu krve a hladinu hořčiku. Vyšetřovali pracovníci veterinární nemocnice v Hranicích.

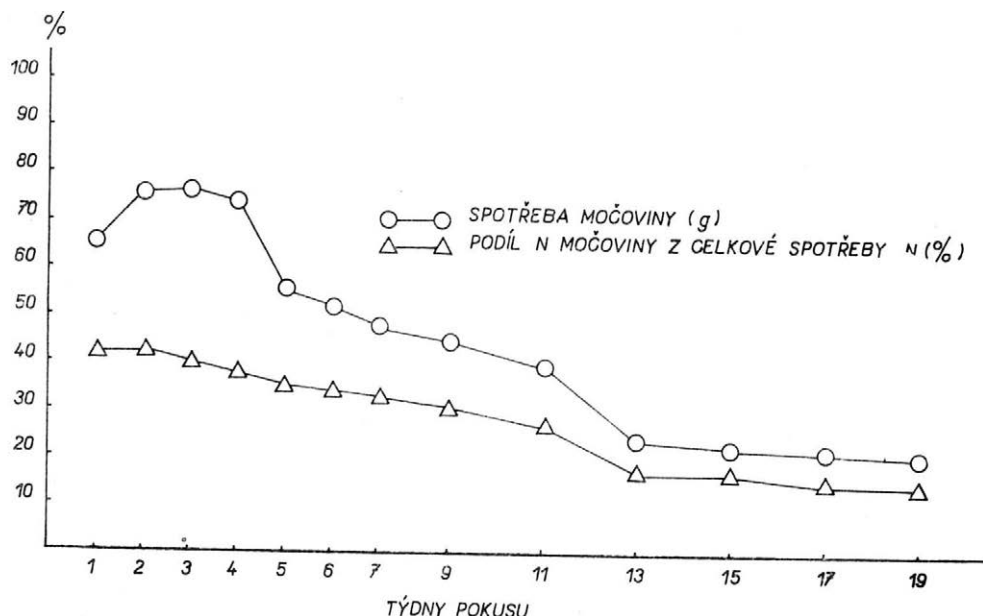
Po ukončení pokusu po 133 dnech zkrmování močoviny bylo šest pokusných a šest kontrolních zvířat poraženo. Histologicky vyšetřili játra a ledviny pracovníci Státního veterinárního ústavu v Olomouci.

VÝSLEDKY

SPOTŘEBA MOČOVINY

Průměrné stáří telat při zahájení pokusného zkrmování močoviny činilo 44,33 dne ($v = 8,10$) a mezními hodnotami bylo 39 až 49 dní. Váha telat kolísala od 45,7 do 74,5 kg a v průměru dosáhla 61,06 kg ($v = 12,33$). V den, kdy byla poprvé předložena jadrná krmná směs s 3 % močoviny, tj. při uvede-

g/100kg ŽIVÉ VÁHY



1. Průměrná denní relativní spotřeba močoviny v týdenních, resp. čtrnáctidenních intervalech

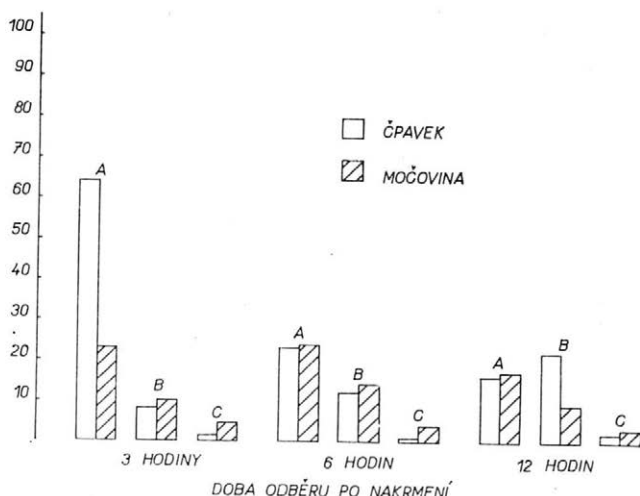
ném stáří a váze, dosáhla spotřeba močoviny v průměru na jedno tele 34,4 g (1147 g jaderné směsi) a v přepočtu na 100 kg živé váhy 56,34 g s mezními hodnotami 31,7 a 70,6 g. Průběh průměrné týdenní, resp. čtrnáctidenní spotřeby je uveden na obr. 1. Spotřeba močoviny dosáhla v průměru prvního týdne zkrmování hodnoty 65,4 g/100 kg, stoupala až do maxima ve třetím týdnu na 76,39 g/100 kg. Od tohoto období, tj. přibližně od stáří devíti týdnů, byl zaznamenán pozvolný pokles relativní spotřeby močoviny jednak tím, že byla zařazena objemná krmiva, jednak regulací spotřeby jaderné krmné směsi. Během posledního období sledování, kdy byla spotřeba absolutně i relativně nejnižší, činila absolutní spotřeba 30 g na kus a den a byla jednotná pro všechna telata. V přepočtu podle živé váhy kolísala od 18,10 g do 25,59 g s průměrem 20,83 g na 100 kg živé váhy. Vzhledem k tomu, že spotřeba senáže se během pokusu zvyšovala a naopak podíl jaderných krmiv se postupně snižoval, měnil se také podíl N-močoviny v krmné dávce. V prvních dvou týdnech, kdy byla zkrmována pouze jaderná krmná směs, dosáhl N močoviny 42,8 % celkové denní spotřeby N. Později, a to až do konce pokusu, podíl N močoviny v krmné dávce pozvolna klesal až na hodnotu 14,2 % v posledním období pokusu (obr. 1).

HLADINA ČPAVKU BACHOROVÉ TEKUTINY

Po nakrmení (3 hodiny) zvýšilo se výrazně ($P < 0,001$) množství čpavku v bachorové tekutině. Hladina dosahovala v průměru 64 mg na 100 ml, což představovalo přibližně čtyřnásobek množství zjištěného v lačném stavu (12 hodin po nakrmení). V některých případech byly zjištěny hodnoty kolem 100 mg%. Při odběru za další tři hodiny klesla již úroveň čpavku téměř na hodnoty výchozího stavu a rozdíly byly pod hranici průkaznosti (obr. 2).

Vliv močoviny na vývoj čpavku je patrný zejména ze srovnání s rybí moučkou (B) nebo se základní krmnou směsí bez koncentráту N-látek (C), kde je obsah mimořádně nízký pro nedostatečný přísun dusíku.

mg VE 100 ml



2. Úroveň čpavkového N v bachorové tekutině a úroveň N močoviny krevního séra v různé době po nakrmení

ÚROVEŇ MOČOVINY V KREVNÍM SÉRU

Při odběru za tři a šest hodin po nakrmení jsme zjistili poměrně vysoké hodnoty N močoviny — 23, resp. 24 mg %. Později nastal průkazný pokles ($P < 0,05$) na hodnotu 17 mg %. Úroveň N močoviny ve srovnání se skupinami B a C můžeme hodnotit jako velmi vysokou, a to v celém intervalu mezi krmním (obr. 2).

KONCENTRACE VODÍKOVÝCH IONTŮ

V době po nakrmení, tj. při odběrech za tři hodiny po předložení krmné dávky byla zjišťována ve všech případech velmi nízká hodnota pH (5,43; $v = 5,99$). Kyselost se udržovala na stejné úrovni i při odběru za šest hodin po nakrmení a teprve v lačném stavu (12 hodin po nakrmení) došlo k výraznému zvýšení pH o 1,57 ($P < 0,01$) na hodnotu 7,00. Výrazný vliv zkrmování močoviny na vývoj kyselosti bachorové tekutiny nebyl pozorován.

KLINICKÉ PŘÍZNAKY U TELAT

Pozorování stavu a chování telat bylo zaměřeno především na počáteční příznaky intoxikace. Teprve po jejich případném zjištění mělo být zahájeno podrobnější šetření pozitivních případů, a to celého průběhu i rozsahu vzniklých poruch. Můžeme však konstatovat, že v žádném případě nedošlo k úhynu pokusných zvířat a že nebyly pozorovány příznaky ze syndromu otravy močovinou. Všechny sledované krevní hodnoty byly u všech zvířat ve fyziologických mezích, a proto je neuvádíme.

ORIENTAČNÍ HISTOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ LEDVIN A JATER

Ihned po skončení pokusu bylo šest pokusných zvířat kontrolně poraženo. Současně bylo poraženo šest zvířat kontrolních, která byla krmena stejnou krmnou dávkou, ale bez močoviny. Hlavní pozornost byla věnována vyšetření jater a ledvin. Tabulka I ukazuje váhové poměry obou orgánů ve vztahu k porážkové váze. Z údajů je možné konstatovat, že mezi pokusnými a kontrolními zvířaty nebyly rozdíly ve váze jater a ledvin. Tab. II uvádí výsledky histologického vyšetření. Z něho vyplývá, že u kontrolních zvířat nebyl zjištěn žádný nález. Naopak z pokusné skupiny byla u dvou telat zjištěna významnější tuková infiltrace a u dvou usazeniny solí ve sběrných kanálcích ledvin. Zbývající dvě zvířata byla bez nálezu.

I. Váha jater a ledvin v procentech porážkové váhy zvířat

	Skupina	
	pokusná	kontrolní
Játra		
$\bar{x}$	1,503	1,567
v	10,980	8,930
$t_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}$	0,728	
Ledviny		
$\bar{x}$	0,318	0,300
v	11,010	7,670
$t_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}$	1,058	

II. Výsledky histologického vyšetření ledvin

Číslo telete	Nález
Skupina kontrolní	
5	bez patologicko-anatomických změn
13	bez patologicko-anatomických změn
17	bez patologicko-anatomických změn
19	bez patologicko-anatomických změn
28	tuková infiltrace jaterních buněk ve fyziologických mezích
42	tuková infiltrace jaterních buněk ve fyziologických mezích
Skupina pokusná	
11	zřetelná vakuolizace jaterních buněk, způsobená přítomností lipoidních složek, kulatobuněčná infiltrace v portobiliárních prostorech
26	zřetelná vakuolizace jaterních buněk, způsobená přítomností lipoidních složek, kulatobuněčná infiltrace v portobiliárních prostorech
16	v luminu některých sběrných kanálků ledvin usazeniny solí kyseliny močové jako důsledek poruch přeměny nukleoproteinů
39	v luminu některých sběrných kanálků ledvin usazeniny solí kyseliny močové jako důsledek poruch přeměny nukleoproteinů
22	bez patologicko-anatomických změn
31	bez patologicko-anatomických změn

Z každé dvojice telat s nálezy na játrech bylo vždy jedno s nadprůměrným váhovým přírůstkem a jedno s podprůměrným váhovým přírůstkem (11 = 625 g; 26 = 735 g). Zcela obdobná situace vyplynula při posouzení dvojice telat s nálezy na ledvinách (16 = 626 g; 39 = 738 g).

ÚROVEŇ Mg KREVNIHO SÉRA

Při odběru krve těsně před ukončením pokusného období jsme zjistili u telat, jimž se zkrmovala močovina, obsah 2,52 mg % ($v = 11,9$; max. = 3,2; min. = 2,0) Mg v krevním séru. Tato hodnota ukazuje, že organismus telat byl dostatečně zásoben hořčíkem. Obsah byl však o 0,20 mg % nižší ve srovnání s kontrolními telaty, kterým se močovina nezkrmovala. Uvedený rozdíl je statisticky významný ($P < 0,01$). Rozdíly v obsahu Mg krevního séra při ostatních odběrech byly absolutně menší a pod hranicí průkaznosti.

DISKUSE

Hlavní pozornost při sledování i vyhodnocení výsledků bylo třeba soustředit na dobu, kdy se začala močovina zkrmovala a na následujících pět týdnů; tehdy byla spotřeba močoviny nejvyšší (obr. 1). Postup dodržovaný při začátku zkrmování močoviny způsobil její nárazový přísun; již první den činil 56,34 g na 100 kg živé váhy. Organismus musel od prvního dne zpracovávat bez pozvolné adaptace dávky močoviny, které někteří autoři zahrnují do sféry akutní toxicity.

Tento stav byl vyvolán požadavkem na vysokou úroveň dusíkaté výživy v tomto odchovu i přesto, že mohl být dodržen obecně doporučovaný podíl 3 % močoviny v jaderných krmivech a jen mírně byla překročena doporučovaná úroveň 30 % N močoviny z celkové krmné dávky. Uvedené dávky močoviny nezpůsobily v žádném případě úhyn pokusných zvířat, a to ani v jiných pokusech, provedených přibližně stejnou metodikou (Š r á m e k, P i n d á k 1970). Ani v době největší spotřeby močoviny v kritickém období po zahájení pokusu nebyly pozorovány příznaky akutní otravy močovinou. Ze spotřeby krmiv vyplývá (Š r á m e k 1970), že dávky močoviny nedosáhly takové úrovně, aby se jim organismus bránil omezením příjmu krmiva, o kterém se zmiňuje S t a n g e l (1967), B a l d u a n a kol. (1969). O dobrém stavu svědčí také přírůstky živé váhy, které do tří měsíců byly úměrné využití močoviny. Zkrmováním močoviny se zvýšil podíl N vylučovaného moči, a to nejen ve srovnání s deficitní krmnou dávkou, ale i s ostatními koncentráty N-látek (Š r á m e k 1970). Hladina Mg v krvi nasvědčuje, že organismus byl i u zvířat krmených močovinou dostatečně zásoben hořčíkem.

Za hlavní příčinu úspěšného zkrmování močoviny u telat v uvedeném věku je možno považovat typ krmné dávky. Je-li složena výhradně nebo převážně z jaderných krmiv, vyznačuje se vysokou koncentrací živin a současně vysokou energetickou hodnotou. Takový typ krmné dávky má za následek velmi intenzivní průběh fermentačních pochodů nejen s výrazným poklesem koncentrace vodíkových iontů v době po nakrmení, ale téměř po celý interval mezi krmeními. Podle prací C o o m b e h o a kol. (1960), W a r r e n a (1962) a dalších můžeme předpokládat ve větším rozsahu vznik iontu NH_4^+ na úkor NH_3 , a tedy omezenou adsorpci čpavku zejména v kritickém období po nakrmení, kdy je nízkým pH eliminována intenzivní hydrolyza močoviny. Ze souhrnné práce S t a n g e l a (1967) nelze chronickou toxicitu močoviny považovat za významný problém. Přesto výsledky tohoto pokusu nevylučují zkrmování močoviny jako příčinu patologického nálezu histologického šetření jater a ledvin poražených zvířat. Je třeba jen dodat, že toto vyšetření nebylo úplné a výsledky nejsou zcela přesvědčivé.

V pokuse byla zkrmována močovina v sypké směsi jaderných krmiv, tedy formou, která umožňuje její intenzivní a rychlý rozklad v bachoru. Je možné předpokládat, že úpravou močoviny (např. obdukcí) nebo krmných směsí (např. granulováním), zpomalující hydrolyzu močoviny a uvolňování čpavku, by se přispělo ke zvýšení stupně využití a ještě k dalšímu zvýšení jistoty s ohledem na toxicitu.

Literatura

- AUSTIN J., 1967, Urea toxicity and its prevention. In: BRIGGS M. H., Urea as a protein supplement. Pergamon Press Ltd., Oxford: 173-184.
- BALDUAN G., VOIGT J., STEGER H., PIATKOWSKI B., 1969, Über den Einfluß gestaffelter Harnstoffgaben bei einheitlicher Stroh-Stärke-Grundration auf N-Bilanz und Pansenfermentation von Kühen. Archiv f. Tierernährung 19, 7/8 : 513-520.
- BULLINGTON T. H., BYRD C. E., HARRIS T. W., 1955, Urea poisoning the bovine. North. Amer. Vet. 36 (2) : 107-109.
- COOMBE J. B., TRIBE D. E., MORRISON J. W. C., 1960, Some experimental observations on the toxicity of urea to sheep. Austr. J. Agr. Res. 11 : 247-256.
- DINNING J. S., BRIGGS H. M., GALLUP W. D., ORR H. W., BUTLER P., 1948, Effect of orally administering urea on the ammonia and urea concentration in the blood of cattle and sheep, with observations on blood ammonia levels associated with symptoms of alkalosis. Am. J. Physiol. 153 : 41-46.

- FRASER C. M., 1963, Urea poisoning in cows at pasture. Canadian Vet. J. 4 (2) : 51-53.
- GÄRTNER K., 1963, Untersuchungen in vitro über die Ammoniakpassage durch die Pansenschleimhaut von Rindern und deren Beeinflussung durch pH-Wert und antidiuretisches Hormon. Zbl. Veterinärmed., Reihe A, X, 11.
- HEAD M. J., ROOK J. A. F., 1955, Hypomagnesaemia in dairy cattle and its possible relationship to ruminal ammonia production. Nature 176 : 262-263.
- HEAD M. J., ROOK J. A. F., 1957, Some effects of spring grass on rumen digestion and metabolism of the dairy cow. Proc. Nut. Soc. 16 (1) : 25-30.
- HÜBNER G., GÜRTLER H., ULBRICHT M., WETZEL K., 1966, Untersuchungen zum N-Stoffwechsel beim laktierenden Rind unter Verwendung von oral verabreichten Harnstoff — (¹⁵N) 14. Mitteilung. Archiv f. Tierernährung 16, 4/5 : 443-456.
- LÍZAL F., OPLETALOVÁ L., 1962, Uplatňování močoviny v krmné dávce dojnic. I. část. Močovina v jaderné směsi. Živočišná výroba 7, 11 : 781-794.
- MASON T. R., 1967, Feeding 45 % urea to beef cattle. Feed Management 18, 1 : 31-32.
- PIATKOWSKI B., 1966, Ernährungsstudien an Kälbern. 3. Mitt. Verdaulichkeit und Nährstoffverwertung von Fischmehl, Erdnußextraktionsschrot bzw. Harnstoff in pelletierter Form bei frühabgesetzten Kälbern bis zu 190 kg Lebendgewicht. Arch. f. Tierernährung 16, 1 : 51-55.
- PIERSON R. E., AANES W. A., 1959, Urea poisoning in ruminants; report of a case in feed lambs. Allied Vet. 30, 5 : 136-139, 156.
- PIETERSE P. J. S., DE KOCK J. P., 1962, Urea proved effective in mineral lick. Farming in S. Africa, 30.
- STANGEL H. J., 1967, History of the use of urea in ruminant feeds. In: BRIGGS M. H., Urea as a protein supplement. Pergamon Press Ltd., Oxford: 3-32.
- STUDT E., 1968, Erfahrungen mit Harnstoff in der Jungbullenmast. Der Tierzüchter 20, 4 : 116-118.
- SZWABOWICZ A., 1962, Otrava močovinou u skotu. Med. Vet. Warszawa 18 : 330-333.
- ŠRÁMEK J., 1970, Využití močoviny telaty od 6 do 13 týdnů stáří. Živočišná výroba (v tisku).
- ŠRÁMEK J., PINĎÁK J., 1970, Využití dusíku krmných směsí s podílem různých koncentrátů N-látek časné odstavenými telaty. Živočišná výroba 7-8 : 535-542.
- VOISIN A., 1963, Die Weidetetanie. BLV Verlagsgesellschaft München, Basel, Wien.
- WARREN K. S., 1962, Ammonia toxicity and pH. Nature 195 : 47-49.
- YOSHIDA J., NAKAMURA R., 1963, Studies on the toxicity of urea and its control. VII. Effect of pH of rumen contents on ammonia absorption. Jap. J. Zootech. Sci. 34 : 275-281.

Došlo dne 1. 7. 1970

ШРАМЕК Й. (Научно-исследовательский институт по разведению крупного рогатого скота, Рапотин, Чехословакия). Влияние высоких доз мочевины на состояние здоровья телят. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 285-294, 1971.

При исследовании использования различных источников азотистых веществ рано отнятыми телятами изучался вопрос, не проявляются ли токсически высокие дозы мочевины. Начиная с среднего возраста телят, т. е. 44,33 дня со средним весом 61,06 кг, рано отнятым телятам скармливалась кормосмесь с 3%-ным содержанием мочевины. На первой неделе было израсходовано 34,4 г мочевины, что представляет 56,34 на 100 кг живого веса. Максимального потребления мочевины было достигнуто на третьей неделе скармливания, когда значения составляли 76,39 г на 100 кг живого веса. Спустя три часа после скармливаемого кормового рациона были установлены высокие значения аммиачного азота в жидкости рубца. Также существенным образом повысился уровень мочевины в сыворотке крови. Концентраты вызывали весьма интенсивные ферментационные процессы в рубце с низкой концентрацией водородных ионов (pH = 5,43), скармливание мочевины на них не влияло. Признаки острой токсикации мочевиной не наблюдались даже в течение 3 недель после начала опыта. Гистологические диагнозы на печени и почках, однако, не исключают вред-

ного влияния скормливания мочевины на состояние здоровья телят. Опыт показал, что рано отнятые телята обладают руминальной деятельностью высокого уровня и что применение мочевины в кормовых рационах не исключено.

токсикация; ранний отъем; токсичность мочевины

ŠRÁMEK J. (Research Institute of Cattle Breeding Czechoslovakia). *Effect of High Urea Doses on the State of Health in Calves*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 285-294, 1971.

During the research work conducted with view to investigate the utilization of nitrogenous substances of different sources by early weaned calves, there was studied also the possibility of a toxic effect of high urea doses on the animals. Calves of a medium age of 44,33 days and an average weight of 61,06 kg were fed a feeding mixture for early weaning, containing 3 % of urea. During the first week of feeding this feed ration to the animals, the consumption of urea attained levels of about 34,4 g corresponding to 45,34 g per 100 kg live weight. The maximum urea consumption was registered during the third week of the experiment reaching values of 76,39 g per 100 kg live weight. Three hours after feeding there could be observed high levels of ammonia N in the rumen liquid. At the same time there was also registered a significant rise in the urea level of the blood serum. The administration of feed rations containing concentrated feedstuffs produced very intensive fermentation processes in the rumen with inferior concentration values of hydrogen ions ($\text{pH} = 4,43$) on which the urea additions had no significant effect. There could not be observed symptoms of acute urea intoxications neither during the feed trial which lasted for a period of three weeks nor immediately after the starting of the experiment. The histologic findings in the liver and the kidneys indicate that a possible unfavourable effect on the state of health of the animals cannot be excluded. By the results of the trial it was proved that early weaned calves registered a high level of intensive rumen activity and that it was possible to feed urea to them with their diet.

intoxication; early weaning; toxicity of urea

ŠRÁMEK J. (Forschungsanstalt für Rinderzucht, Rapotín, Tschechoslowakei). *Einfluß hoher Harnstoffgaben auf den Gesundheitszustand der Kälber*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 285-294, 1971.

Bei Untersuchungen über die Ausnutzung verschiedener Stickstoffquellen bei früh abgesetzten Kälbern wurde die Frage gelöst, ob sich hohe Harnstoffgaben nicht toxisch äußern. An Kälber ab Alter von durchschnittlich 44,33 Tagen im Gewicht von zirka 61 kg wurde ein Mischfutter für frühen Kälberabsatz mit einem Gehalt von 3 % Harnstoff verabreicht. In der ersten Woche der Verfütterung dieses Mischfutters erreichte der durchschnittliche Harnstoffverbrauch 34,4 g, was 56,34 g je 100 kg Lebendgewicht entspricht. Der höchste Verbrauch wurde in der dritten Fütterungswoche erreicht, wo die Kälber durchschnittlich 76,39 g je 100 kg Lebendgewicht aufnahmen. Drei Stunden nach der Verabreichung der Futterration wurden in der Pansenflüssigkeit hohe Ammoniakstickstoffwerte festgestellt. Auch das Niveau des Harnstoffs im Blutserum erhöhte sich wesentlich. Der Kraftfuttertyp der Futterration verursachte sehr intensive Fermentationsprozesse im Pansen mit einer niedrigen Wasserstoffionen-Konzentration ($\text{pH} = 5,43$), welche durch die Harnstoffverfütterung signifikant nicht beeinflusst wurde. Symptome einer akuten Intoxikation mit Harnstoff wurden sogar in drei Wochen nach Beginn des Versuchs nicht beobachtet. Die histologischen Befunde an der Leber und den Nieren schließen aber eine schädliche Wirkung der Harnstoffverfütterung auf das gesundheitliche Befinden der Kälber nicht aus. Der Versuch brachte den Nachweis dafür, daß die früh abgesetzten Kälber eine Rumentätigkeit auf hohem Niveau aufweisen und daß die Harnstoffbenutzung möglich ist.

Intoxikation; frühzeitiger Absatz; Harnstofftoxizität

Adresa autora:

Ing. J. Šrámek, CSc., Výzkumný ústav pro chov skotu, Rapotín u Šumperka

ZKUŠENOSTI S MAKROAGLUTINAČNÍ REAKCÍ V SÉROLOGICKÉ DIAGNOSTICE LEPTOSPIRÓZ U HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT

B. Pokorný, L. Staroščík

Ústřední státní veterinární ústav, Praha
Bioveta, Ivanovice na Haně

POKORNÝ B., STAROŠČÍK L. *Zkušenosti s makroaglutinační reakcí v sérologické diagnostice leptospiróz u hospodářských zvířat.* Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 295-302, 1971.

Autoři vyzkoušeli na větším počtu sér hospodářských zvířat — koní, skotu a psů — sklíčkovou makroaglutinační reakci k urychlené diagnostice leptospiróz ve srovnání s reakcí mikroaglutinace-lyse leptospir. Použili tří antigenů připravených ze tří u nás nejčastěji se vyskytujících sérotypů leptospir: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. sejroe* a *L. grippotypbosa*. Antigény byly vyrobeny podle návodu Galtonové a kol. (1958). Ve výsledcích obou reakcí nebylo možno postihnout rozdíly v sérech různých druhů zvířat. Výsledek makroaglutinační reakce závisí v první řadě na kvalitě antigenu. Tak s antigény *Weil* a *sejroe* se shodovaly co do počtu sér obě reakce již v titru mikroaglutinace 1 : 400, kdežto s antigenem *grippotypbosa* se i při vysokém obsahu protilátek kryly obě reakce jen ze dvou třetin až tří čtvrtin v neprospěch makroaglutinačního testu, jímž můžeme vyřadit negativně reagující séra. Ostatní vzorky je pak bezpodmínečně nutné vyšetřit reakcí mikroaglutinace-lyse leptospir.

leptospiiry; sérologie; antigen; výroba; makroaglutinace

Reakce mikroaglutinace-lyse leptospir se pokládá stále za nejspolehlivější test v sérologické diagnostice leptospirových infekcí. Časová i materiálová náročnost zkoušky a nebezpečí infekce však vedly k hledání jednodušší, rychlejší a bezpečnější reakce. Takovou se ukázala makroaglutinace s mrtvými leptospirovými antigeny. První zmínka o makroaglutinační reakci je v práci Starbuckové a Wardové (1942), po níž následují sdělení Hoaga a kol. (1953), Stoennera (1954) a Brijana (1957). V roce 1958 pak popsala Galtonová a kol. rychlý makroaglutinační test na sklíčku pro sérodiagnostiku leptospirózy. Test, jak uvádí Galtonová a kol. (1962), dával v některých případech na počátku leptospirového onemocnění u lidí pozitivní reakci ještě dříve než mikroaglutinační reakce. V pozdějších stadiích onemocnění byly již nálezy souhlasné v obou reakcích. O dalších zkušenostech s makroaglutinačním testem referují Alexander a kol. (1964), Lelutiu a kol. (1963), Cranford (1964), Wolf a kol. (1966 a 1967) Solorzano (1967) a u nás Vošta (1968).

Cílem naší práce bylo vyrobit a ověřit makroaglutinační leptospirové antigeny v našich podmínkách v souboru sér domácích zvířat.

Kultury leptospir pro přípravu makroaglutinačního antigénu jsme pomnožovali na syntetické živné půdě s hovězím albuminem V. frakce a tweenem 80 podle Ellinghausena a kol. (1965) ve vlastní modifikaci (Starostíková, Horňáková 1969). Kultivace probíhala po inokulaci (asi 10% inokula) v termostatu při 28 °C v baňkách o obsahu 2,0 l, plněných 500 ml media, šest až sedm dní. Dříve než jsme se rozhodli pro kultivaci leptospir na uvedené syntetické půdě, pokoušeli jsme se o vyrobení antigenů pro makroaglutinace z kultur leptospir vyrostlých na Korthofově a Stuartově půdě s králičím sérem, tak jak doporučuje Galtonová a kol. (1958). Kultury pomnožené na těchto půdách však byly značně řidší a kromě toho při prvním odstředění je nebylo možno zbavit jemného detritu, který se potom dostal do antigénu a znesnadňoval jeho resuspendování. Výroba antigenů na těchto půdách byla velmi pracná a výsledek nebyl úměrný vynaložené námaze, neboť antigeny nebyly čisté, byl v nich stále nežádoucí jemný detritus.

Dobře rozrostlé kultury leptospir na albuminové půdě jsme k přípravě antigénu zpracovávali obdobným způsobem, jaký uvádí Galtonová a kol. (1958). Po umrtvení leptospir 0,5% formalinem (2–24 hod.) jsme kultury po mikroskopické kontrole odstřeďovali v uzavřených 100ml lékovkách při 1500 obr./min po dobu 10 minut. Supernatant jsme opatrně odsáli do transfúzních lahví, aby se nesmíchal s hrubým sedimentem. Tuto tekutinu s leptospirami jsme dále odstřeďovali při 10 000 obr./min na odstředivce Janetzki buď v kyvetách o obsahu 20 ml 10 minut, nebo v kyvetách 250 ml po dobu 30 minut. Po odstředění jsme supernatant opatrně slili a sedimentované leptospiry resuspendovali v ředidle tohoto složení: 0,5 % formalinu, 12 % chloridu sodného, 20 % glycerinu, pH = 5,4 až 5,8; množství ředidla představovalo asi 5 % původního množství kultury. Takto získaný antigen jsme homogenizovali pasáží tenkou injekční jehlou a uložili na několik dní v chladniče při 4 °C. Antigen jsme dále naředili pomocí fotokolorimetru Prema s filtrem č. 6 ve zkumavkách o průměru 16 mm tak, že jeho světelná propustnost činila 30 % ve srovnání se 100% propustností čistého ředidla.

Při výrobě těchto antigenů jsme zjistili, že z některých kmenů leptospir lze celkem snadno vyrobit makroaglutinační antigen, ale že na druhé straně jsou mnohé kmeny pro jeho přípravu nevhodné. Potíže se vyskytly zejména s kmeny *L. canicola* — Utrecht, *L. sejroe* — M 48 a téměř se všemi kmeny sérotypu *L. grippityphosa*. Z nich vyrobené antigeny jevíly sklon k autoaglutinaci. V takových případech jsme byli nuceni vyzkoušet k přípravě antigénu jiný kmen téhož sérotypu, u něhož se tato nežádoucí vlastnost nevyskytovala.

Pokud se údržnosti antigénu týče, poznali jsme, že ne všechny antigeny pro makroaglutinaci mají stejnou expirační dobu. Antigeny z kmenů *L. grippityphosa*, *L. canicola* a *L. pomona* jevíly sklon k autoaglutinaci již po třech měsících ode dne výroby, zatímco např. antigeny z *L. tarassovi* a *L. sejroe* byly udržné více než 12 měsíců.

Hotové antigeny jsme prohlíželi mikroskopicky, kontrolovali s fyziologickým roztokem a normálním králičím sérem a zkoušeli v makroaglutinační reakci s homologními a heterologními pozitivními séry ředěnými fyziologickým roztokem 1 : 5 (titry mikroaglutinace zkoušených sér se pohybovaly kolem 1 : 20 000). Za vyhovující jsme pokládali antigeny, které se jevíly při mikroskopické prohlídce zcela homogenní jak v koncentrovaném stavu, tak po naředění fyziolo-

gickým roztokem nebo negativním králičím sérem. V makroaglutinační reakci potom musely tyto antigény dávat zřetelnou pozitivní reakci jen s homologními séry, popřípadě se séry příbuzných sérotypů. U žádného z antigenů nesmělo dojít k autoaglutinaci. Takto vyzkoušené antigény byly rozplněny do penicilinových lahviček po 5 ml a označeny štítky s příslušnými údaji.

Pokud jde o vlastní provedení makroaglutinačního testu, volili jsme takový postup, který je jednoduchý, v našich podmínkách dostupný, dává reprodukovatelné výsledky a zachovává přibližně poměr zkoušeného séra a antigenu 1 : 6,5, jak uvádí Galtónová a kol. (1958). Reakci jsme dělali jednoduše tak, že jsme na čisté podložní sklíčko nanášeli antigen a neředěné sérum v izolovaných kapkách kličkami nestejného průměru, pro antigen většími, pro sérum menšími, čímž jsme dostali přibližně ředění séra 1 : 6—7. Další čistou kličkou jsme smísili kapku antigenu a séra a krouživými pohyby sklíčka jsme se snažili dosáhnout důkladného promísení obou složek. Reakce nastupuje nejvýše po dvou minutách a odečítáme ji po čtyřech minutách makroskopicky šikmým pohledem na podložní sklíčko osvětlené zespodu silným světelným zdrojem. V silně pozitivních reakcích se v kapce směsi vytvoří dosti hrubé sraženiny, přičemž se okolní tekutina zcela vyčeří. Při slabších reakcích jsou sraženiny jemnější, někdy jen na periferii kapky a ostatní tekutina zůstává mírně zakalená.

Pro srovnání výsledků jsme souběžně s makroaglutinační reakcí také vyšetřovali reakci mikroaglutinace-lyse.

VÝSLEDKY

K ověření použitelnosti popsané makroaglutinační reakce jsme použili souboru 538 vzorků sér domácích zvířat a její výsledek jsme posuzovali ve vztahu k výsledku reakce mikroaglutinace-lyse. K vyšetření jsme použili tři antigenů připravených ze tří u nás nejčastěji se vyskytujících sérotypů leptospir, vybraných na základě výsledků mikroaglutinační reakce. Byly to antigény z *L. icterohaemorrhagiae*, *L. sejroe* a z *L. grippotyphosa*. Pro nedostatek zkušeností jsme použili pouze monovalentní antigény. Reakci mikroaglutinace-lyse leptospir jsme dělali standardní metodou s použitím 10 sérotypů leptospir z 10 sérologických skupin.

K vyšetření makroaglutinační reakcí jsme použili pouze sér, která reagovala v mikroaglutinační reakci pozitivně s některým z použitých tří antigenů, byť v nízkém titru (100, 200), neboť předběžnými zkouškami jsme zjistili, že séra naprosto negativní v mikroaglutinační reakci reagovala zcela negativně i makroaglutinačním testem. Tato séra nejsou proto v přiložené tabulce zahrnuta (tab. I). Z výsledků v této tabulce obsažených vyplývá, že nelze zaznamenat rozdíly v poměru obou reakcí u různých druhů zvířat. Poměr obou reakcí je dále značně závislý na množství obsažených protilátek a na druhu i šarži antigenu. Proto v sérech s nízkým obsahem protilátek (1 : 100, 1 : 200) se výsledky obou reakcí většinou neshodují a převažují nálezy ve prospěch mikroaglutinační reakce. Pouze ve skupině sér koní a částečně i skotu jsme v makroaglutinaci postihli i při nízkém titru protilátek — jmenovitě s antigeny *sejroe* a *grippotyphosa* — větší počet pozitivních reakcí než v mikroaglutinační reakci; to značí, že jsme v těchto případech buď postihli makroaglutinačním testem nízkou hladinu protilátek i tam, kde byla mikroaglutinační reakce negativní, nebo spíše, že jde o nespecifickou reakci. V uvedených případech byla totiž reakce s homologním antigenem většinou negativní ve vztahu k mikroaglutinační reakci.

I. Výsledky mikroaglutinační a makroaglutinační reakce na leptospirózu v sérech hospodářských zvířat

Druh	Koně 132 (140)						Skot 271						Psi 101 (127)					
	<i>icterohaem.</i>		<i>sejroe</i>		<i>grippotyph.</i>		<i>icterohaem.</i>		<i>sejroe</i>		<i>grippotyph.</i>		<i>icterohaem.</i>		<i>sejroe</i>		<i>grippotyph.</i>	
	mikro	makro	mikro	makro	mikro	makro	mikro	makro	mikro	makro	mikro	makro	mikro	makro	mikro	makro	mikro	makro
Negat.	111	115	61	48	35	32	254	244	202	199	57	137	89	91	94	90	62	88
1 : 100	16	12	8	20	9	13	13	24	18	26	33	26	4	2	—	3	4	4
1 : 200	—	—	9	3	8	2	3	3	11	6	56	26	3	1	2	3	5	1
1 : 400	4	4	23	21	13	3	—	—	22	14	58	24	5	5	1	1	16	2
1 : 800 a výše	1	1	27	27	75	58	1	1	18	17	67	58	2	2	4	4	40	32

Teprve při vyšším obsahu protilátek můžeme jmenovitě s antigeny *icterohaemorrhagiae* a *sejroe* zaznamenat úplnou shodu ve výsledku obou reakcí. To platí o reakcích v titru mikroaglutinace 1 : 400 a samozřejmě o reakcích v titrech 1 : 800 a výše, které již považujeme za signifikantní pro pozitivní charakter reakce (viz tab. I). Tuto shodu zjišťujeme však pouze u antigenů *icterohaemorrhagiae* a *sejroe*, kdežto s antigenem *grippotyphosa* se i při vysokém titru protilátek kryly obě reakce jen ze dvou třetin nebo nejvýše ze tří čtvrtin v neprospěch makroaglutinačního testu. Z toho je patrné, že výsledek makroaglutinační reakce závisí také na druhu a kvalitě antigenu. Jak jsme však poznali, liší se z dosud neznámých důvodů i jednotlivé šarže téhož druhu antigenu. Je proto nutné každou šarži antigenu před použitím v diagnostické praxi vyzkoušet se známými negativními a pozitivními séry.

Pokud jde o specifitu makroaglutinačního testu, z uvedených výsledků vyplývá, že reakce je poměrně specifická s antigeny *icterohaemorrhagiae* a *sejroe*. Pouze v některých případech reakce s *L. grippotyphosa* i ve vysokém titru mikroaglutinační reakce jsme zaznamenali nespecifickou reakci s antigenem *sejroe* a negativní reakci s antigenem *grippotyphosa* v makroaglutinačním testu. Z toho vychází právě zmíněná neshoda v počtu výsledků obou reakcí s antigenem *grippotyphosa*.

DISKUSE

Z uvedených výsledků vyplývá, že makroaglutinačním testem lze poměrně spolehlivě zachytit pouze vyšší hladiny protilátek ve vyšetřovaných sérech. U protilátek v nižších hladinách není toto vyšetření spolehlivé. Výsledek tohoto testu závisí dále na druhu a na kvalitě použitých antigenů, eventuálně i na jednotlivých šaržích téhož antigenu. To ovšem znamená, že se nám nepodařilo přípravu antigenů patřičně standardizovat, ač při jejich výrobě zachováváme naprosto týž postup. Galtonová, podle jejíhož popisu jsme připravovali své antigeny, vykazuje ve své práci téměř jednoznačnou shodu výsledků obou srovnávaných reakcí. Připravovala však antigeny z kultur leptospir chovaných na Korthofově mediu, kdežto my jsme z technických důvodů používali ke kultivaci albuminové syntetické půdy s tweenem 80. V tom může právě spočívat rozdíl v kvalitě používaných antigenů. Pro makroaglutinační reakci je nutno používat čerstvých sér, pokud možno sterilních. Séra kontaminovaná, haemolytická nebo chylózní dávají nespecifickou reakci. Co se týče spolehlivosti makroaglutinačního testu, uvádí Wolf a kol. (1966), že při vyšetřování sér lidí nemocných leptospirozou obdrželi při vyšetřování oběma metodami shodné výsledky. Méně přesvědčivé byly výsledky jejich vyšetřování zdravých lidí v Surianu a Kenyi. Podle Solorzana (1967) byly zjištěny značné rozdíly při srovnávání výsledků mikro a makroaglutinační reakce v sérech skotu z prostředí zamořeného leptospirami ze skupiny *hebdomadis*. Diference se tu vysvětlují malou citlivostí makroaglutinačního antigenu z kmenů *L. sejroe* a hypersenzitivitou makroaglutinačních antigenů z kmenů *L. icterohaemorrhagiae* a *L. canicola*.

V závěru je možno konstatovat, že makroaglutinační sklíčkovou reakci lze s výhodou použít při depistážním vyšetřování většího materiálu bez ohledu na druh zvířat, z něhož krev pochází. Lze jí poměrně bezpečně vyřadit séra negativní a při použití vhodných antigenů zachytit i druhovou specifičnost séra s vysokým obsahem protilátek. V žádném případě jí dosud nelze nahradit reakci mi-

kroaglutinace-lyse leptospir, již je nutno vyšetřit všechna séra, reagující makroaglutinačním testem pozitivně nebo dubiálně, a to jak z důvodů upřesnění diagnózy, tak ke stanovení výše titru protilátek.

Literatura

- ALEXANDER A. A., YAGER R. H., KEEFE T. J., 1964, Leptospirosis in Swine. Bull. Off. Int. Epizoot. 61 : 273.
- BRYAN H. S., 1957, Studies on leptospirosis in domestic animals. VII. A rapid plate agglutination test for *L. pomona*. Vet. Med. 52 : 111.
- CRAWFORD R. P., 1964, Evaluation of a Plate Test for the Detection of Leptospiral Antibodies in Bovine Serum. J. Amer. Vet. Med. Ass. 145 : 683.
- ELLINGHAUSEN H. C., 1965, Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 15 other serotypes a serum-free medium employing oleic albumin complex. Amer. Journ. vet. Res. 110, 26 : 39.
- GALTON M. M., MENGES R. H., SHOTTS E. B., NAHMIAS A. J., HEATH C. W., 1962, Leptospirosis. Bacto-Leptospira Antigens and control Antisera. USA, Public Health Service : 951.
- GALTON M. M., POWERS D. K., HALL A. D., CORNEL R. G., 1958, A rapid Macroscopic-Slide Screening Test for the Serodiagnosis of Leptospirosis. Amer. Journ. Vet. Res. 19 : 505.
- HOAG W. G., GOCHENOUR J., YAGER R. H., 1953, Leptospiral macroscopic agglutinating antigens. Proc. Soc. Expt. Biol. and Med. 83 : 490.
- LELUTIU C., SOTIRIU E., ANGHEL W., 1965, Cercetari supra reactiilor de macroaglutinare si de fixare a complementului, comparativ cu reactia de aglutinare-liza in diagnosticul leptospirozei la animale. Lucraril Inst. Cercet. Veterin. si Bioprep. „Pasteur“ 4, 1/2 : 249.
- SOLORZANO R. F., 1967, A comparison of the rapid macroscopic Slide-Agglutination Test with the microscopic Agglutination Test for Leptospirosis. Cornell Vet. 57, 2 : 239.
- STARBUCK E. V., WARD T. G., 1942, Comparison of a recently developed macroscopic agglutination test for the diagnosis of *leptospirae jaundice* with the standard microscopic test. Journ. inf. Dis. 70 : 88.
- STAROŠTÍK L., HORŇÁKOVÁ M., 1969, Syntetická půda s hovězím albuminem domácí výroby pro kultivaci leptospir. Veterinářství 19 : 301.
- STOENNER H. G., 1954, Application of the capillary tube test and a newly developed plate test to the serodiagnosis of bovine leptospirosis. Amer. Journ. Vet. Res. 15 : 434.
- SZEMERÉDI, KEMENES, VIZY, 1966, Objektträger-Agglutinationsprobe zum schnellen Erkennung der *Leptospira pomona* Infektion. Mag. Allartovosok Lapja 21, 4 : 161.
- VOŠTA J., 1968, Diagnostika leptospiroz makroaglutinací na sklíčku. Sborník provozně ekonom. fakulty VŠZ Čes. Budějovice, VI : 226.
- WOLFF J. W., BOHLANDER H. J., 1966, Evaluation of Galton's macroscopic slide test for the serodiagnosis of leptospirosis in human serum samples. Ann. Soc. belge Méd. trop. 46 : 123.
- WOLFF J. W., BOHLANDER H. J., 1967, Screening Test in human Serum samples with *Leptospira biflexa* Antigens incorporated in Galton's Macroscopic Slide Test. Trop. geogr. Med. 19 : 63.

Došlo dne 18. 9. 1970

ПОКОРНЫ Б., СТАРОШТИК Л. (Центральный государственный ветеринарный институт, Прага, Биовега, Ивановице на Гане, Чехословакия. Опыт с макроагглютинирующей реакцией в серологической диагностике лептоспирозов у сельскохозяйственных животных. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 295-302, 1971.

Авторы на большом числе сывороток сельскохозяйственных животных, т. е. на лошадях, крупном рогатом скоте и собаках, обследовали макроагглютинирующую реакцию на стек-

лышке для ускорения диагностики лептоспирозов по сравнению с реакцией микроагглютинации-лисе лептоспир. Они пользовались тремя антигенами, приготовленными из трех у нас чаще всего встречающихся серотипов лептоспир, а именно *L. icterohaemorrhagiae*, *L. sejroe* и *L. grippotyphosa*. Антигены были приготовлены по инструкции Галтона и колл. (1958). В результатах обеих реакций нельзя было отметить различия в сыворотках различных видов животных. Результат макроагглютинирующей реакции, в первую очередь, зависит от качества антигена. Так, например, с антигенами *Weil* и *sejroe*, что касается числа сывороток, совпадали обе реакции уже в титре микроагглютинации 1 : 400, в то время как с *grippotyphosa* даже при высоком содержании антител обе реакции совпадали только в $2/3-3/4$ за счет макроагглютинирующего теста, при помощи которого мы можем исключить отрицательно реагирующую сыворотку. Остальные пробы, безусловно, необходимо обследовать реакцией микроагглютинации-лисе лептоспир.

лептоспиры; серология; антиген; производство; макроагглютинация

POKORNÝ B., STAROŠTÍK L. (State Central Veterinary Institute, Praha; Bioveta, Ivanovice na Hané, Czechoslovakia). *Experience with Macro-Agglutination Reaction in the Serologic Diagnostics of Leptospiroses in Farm Animals*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 295-302, 1971.

The authors applied the macro-agglutination test on glass slides in order to investigate a greater number of samples of blood sera obtained from agricultural and domestic animals, i. e. horses, cattle, dogs, etc., with the aim to establish a more rapid method of leptospirosis diagnostics compared with the commonly used micro-agglutination-lysis of *Leptospira*. For the first trial there were used three antigens manufactured from three of the most common serotypes of *Leptospira* in our regions, i. e. *L. icterohaemorrhagiae*, *L. sejroe* and *L. grippotyphosa*. The antigens were prepared according to the method elaborated by Galton et al. (1958). The results obtained by both methods did not allow to establish any differences between the sera of the individual animal species involved. The results of the macro-agglutination test depend first of all on the quality of the antigen. With the antigens *Weil* and *sejroe* there were registered by both methods concordant values in the total number of sera already at the micro-agglutination titre value of 1 : 400 while with the antigen *grippotyphosa* — even at high antibody contents — congruent results were obtained by the two methods only in a third and three quarters of the total number of sera and that to the disadvantage of the macro-agglutination test which can be used for the detection and elimination of sera with negative response. However, it is necessary to examine the rest of the samples by the micro-agglutination-lysis of *Leptospira*.

leptospirae; serology; antigen; production; macro-agglutination

POKORNÝ B., STAROŠTÍK L. (Staatliche Zentralveterinäranstalt, Praha; Bioveta, Ivanovice na Hané, ČSSR). *Erfahrungen mit der Makroagglutinationsreaktion in der serologischen Diagnostik der Leptospirose bei landwirtschaftlichen Nutztieren*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 295-302, 1971.

Die Verfasser überprüften bei einer größeren Anzahl von Seren landwirtschaftlicher Nutztiere, und zwar von Pferden, Rindern und Hunden, die Gläschenmakroagglutinations-Reaktion zur beschleunigten Diagnostik der Leptospirose im Vergleich zur Mikroagglutinations-Lysis-Reaktion der Leptospiren. Sie benutzten drei Antigene, die aus drei in der ČSSR am häufigsten vorkommenden Leptospirenserotypen, und zwar *L. icterohaemorrhagiae*, *L. sejroe* und *L. grippotyphosa* hergestellt wurden. Die Antigene wurden nach der Anleitung von Galton und Koll. (1958), erzeugt. In den Ergebnissen der beiden Reaktionen konnten keine Unterschiede bei den Seren der verschiedenen Tierarten festgestellt werden. Das Ergebnis der Makroagglutinationsreaktion hängt in erster Reihe von der Qualität des Antigens ab. Bei Benutzung der *Weil*- und *Sejroe*-Antigene stimmten in bezug auf die Anzahl der Seren beide Reaktionen bereits im Titer der Mikroagglutination 1 : 400 überein, während bei Benutzung des Antigens *grippotyphosa* beide Reaktionen auch bei hohem Antikörpergehalt nur zu zwei Drittel bis drei Viertel zu ungunsten des Makroagglutinationstestes übereinstimmten, mit welchem man die negativ reagieren-

den Seren ausschalten kann. Die übrigen Blutproben müssen dann bedingungslos mit Hilfe der Mikroagglutinations-Lysis-Reaktion untersucht werden.

Leptospiren; Serologie; Antigen; Herstellung; Makroagglutination

Adresy autorů:

RNDr. B. Pokorný, Ústřední státní veterinární ústav, Praha 6 - Lysolaje, Na Vinici 156, MVDr. L. Starošík, Bioveta, Výzkumné středisko Drnovská, Vyškov - Nouzka

ZÁCHYTY SALMONEL IMUNOFLUORESCENCÍ VE SROVNÁNÍ S KULTIVAČNÍM VYŠETŘENÍM

Z. Tomeš, V. Hrušovská

Vojenský veterinární výzkumný ústav, Praha - Motol

TOMEŠ Z., HRUŠOVSKÁ V. *Záchyty salmonel imunofluorescencí ve srovnání s kultivačním vyšetřením.* Vet. Med. (Praha) 16 (5): 303-309, 1971.

Je popsána záchytnost salmonel rozšířenou kultivační metodou ve srovnání se záchytností těchto zárodků nepřímou imunofluorescenční technikou z otiskových preparátů, ze sedimentu zhomogenizovaného a centrifugovaného materiálu a z preparátů zhotovených z materiálu zhomogenizovaného, chemickou cestou sraženého a centrifugovaného. Z těchto tří imunofluorescenčních metod se nám jeví jako nejúčinnější metoda srážení salmonel chemickou cestou; její předností je vyšší záchytnost salmonel než při použití metody kultivační a konečný výsledek vyšetření je možno sdělit do dvou hodin po započetí práce v laboratoři.

imunofluorescence salmonel; srovnání tří metod zhotovování preparátů pro imunofluorescenční techniku

Problém salmonelóz, a tedy i salmonel, zůstává jak u nás, tak i ve světě stále otevřený.

S tímto problémem úzce souvisí problematika nejen detekce salmonel, ale i jejich rychlého a zároveň spolehlivého záchytu. Rychlost a spolehlivost záchytu je důležitá hlavně z hlediska epidemiologického a epizootologického. Jako rychlá metoda vyšetřování salmonel se jeví metoda imunofluorescenční.

V tomto příspěvku popisujeme záchyt salmonel ze svaloviny a orgánů pokusných zvířat (krysy, morčata, králíci) nepřímou imunofluorescenční technikou ve srovnání s rozšířenou vyšetřovací metodou.

MATERIÁL A METODY

K pokusům jsme použili svalovinu a orgány (slezina, játra, ledvina) krys, morčat a králíků, kterým jsme intraperitoneálně injikovali bakteriální suspenzi salmonel, a to: *Salmonella typhi* murium, *S. enteritidis*, *S. cholerae* suis var. Kunzendorf, *S. dublin* a *S. bareilly*.

Jednomu zvířeti byla injikována suspenze kultury pouze jednoho sérotypu v množství 10^8 – 10^{11} zárodků v 1 ml v různých objemových dávkách, čímž bylo dosaženo různého stupně jak intravitální, tak postmortální infekce pokusných zvířat salmonelami.

Po utracení za 18–24 hodiny, event. po úhynu pokusných zvířat po infekci, jsme — kromě jiného — vyšetřili svalovinu a orgány (tj. slezinu, játra

a ledvinu) rozšířenou kultivační metodou a nepřímou imunofluorescenční technikou a kvantitativně stanovili salmonely ze svaloviny a jater.

Rozšířená kultivační metoda spočívala v primokultivaci na krevní agar a dvě selektivní půdy (Endovu a Gassnerovu půdu, nebo Endovu půdu a agar s fenolovou červení, brilantovou zelení a laktózou) a v kultivaci do Kauffmannovy pomnožovací půdy a do tekuté půdy se seleničitanem. Použili jsme selenitovou půdu národního podniku Imuna, Šarišské Michalany. Pomnožovací půdy jsme inkubovali v termostatu jednak při 37 °C, jednak při 43 °C po dobu čtyř dnů a denně z nich po tuto dobu vyočkovávali na dvě výše uvedené pevně selektivní půdy.

Pro barvení nepřímou imunofluorescenční technikou jsme zhotovili tři druhy preparátů.

a) Po třech otiskových preparátech ze svaloviny a z orgánů vždy nové čerstvé řezné plochy vzorku.

b) Po jednom preparátu ze svaloviny a jater po jejich homogenizaci ve fyziologickém roztoku, přefiltrování přes gázu a následné centrifugaci; po odstranění supernatantu jsme nanесли z vrchní, čirejší vrstvy centrifugátu na podložní sklíčko jednu kapku a po jejím zaschnutí na totéž místo druhou a třetí kapku. Z ostatních vzorků, tj. sleziny a ledviny, nebyla tato metoda realizovatelná pro nedostatečnou velikost těchto orgánů.

c) Po třech preparátech ze svaloviny a jater po vysrážení mikroorganismů chemickou cestou.

Při srážení mikroflóry chemickou cestou jsme materiál nejdříve zhomogenizovali ve fyziologickém roztoku, přefiltrovali přes gázu a do přefiltrovaného homogenizátu postupně přidali roztok uhličitanu sodného a roztok síranu železitého. Aby sedimentace byla dokonalejší, centrifugovali jsme takto sražený homogenizovaný materiál. Supernatant jsme odpipetovali a sraženinu rozpustili přidáním Seignetovy soli (vinan sodno-draselný).

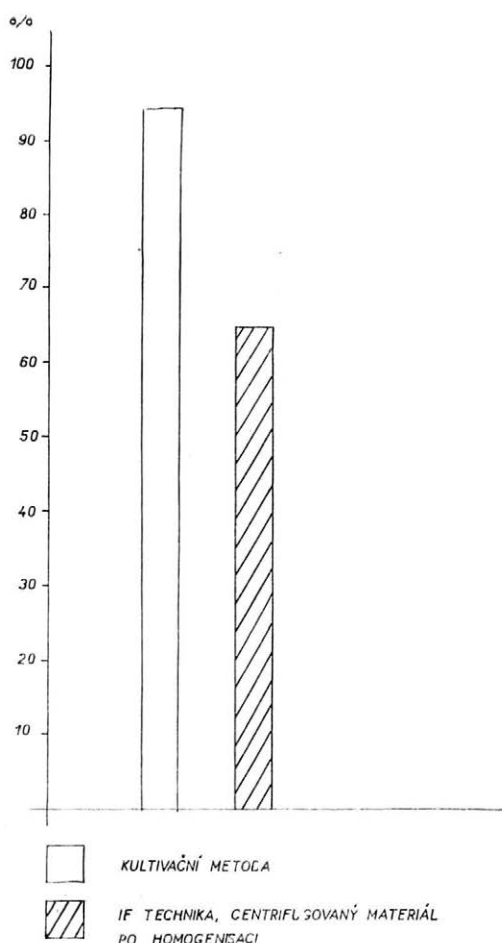
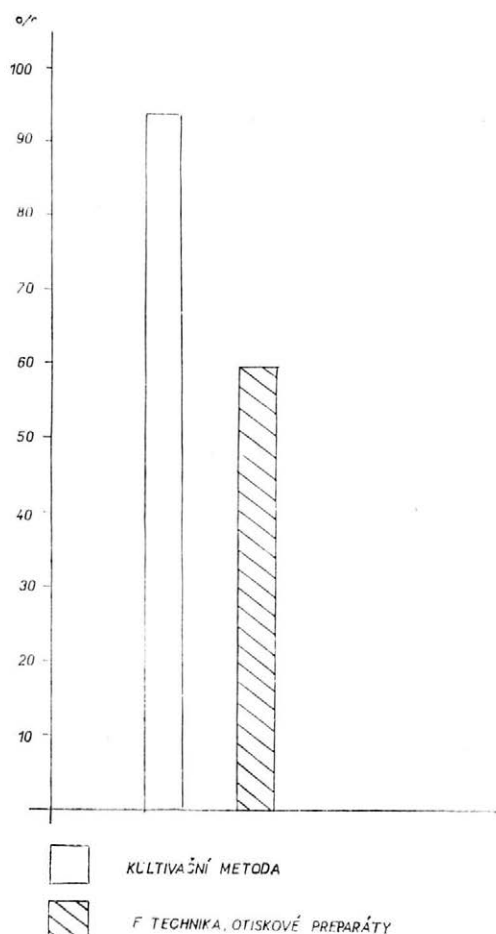
Metoda srážení mikroflóry v homogenizovaném materiálu nebyla v nám dostupné literatuře dosud popsána.

Z takto získaného materiálu, jak již bylo uvedeno, jsme zhotovili tři preparáty a obarvili je nepřímou imunofluorescenční technikou.

Jako antiséra jsme použili Sérum *Salmonella* smíšené I, výrobce Bioveta, Ivanovice na Hané a jako konjugát prasečí globulin proti králíčímu gama globulinu značený FITC, výrobce Ústav sér a očkovacích látek, Praha.

Vzhledem k tomu, že jsme pracovali se vzorky, v nichž se vyskytovaly jednotlivé sérotypy salmonel téměř v čisté kultuře, jsme mohli používat smíšené sérum i neředěné, u konjugátu jsme použili ono nejvyšší ředění, při kterém imunofluorescenční technikou obarvené kmeny salmonel svítily na +++ až +++++, avšak kontrolní preparáty ostatní mikroflóry, jako např. červenka, *Serratia marcescens*, *Erwinia amylovora*, *B. subtilis*, *Shigella dispar* a náhodně zachycené kmeny *E. coli* nesvítily.

Všechny preparáty obarvené imunofluorescenční technikou jsme prohlíželi mikroskopem ML-2 objektivem MI 90 1,25 a okuláry 5X, vždy 50 zorných polí v preparátu a jako pozitivní jsme hodnotili nálezy pouze horizontálně situovaných tyčinek, jejichž kontury zářily na +++ až +++++.



1. Záchyt salmonel rozšířenou kultivační metodou a nepřímou IF technikou z otiskových preparátů

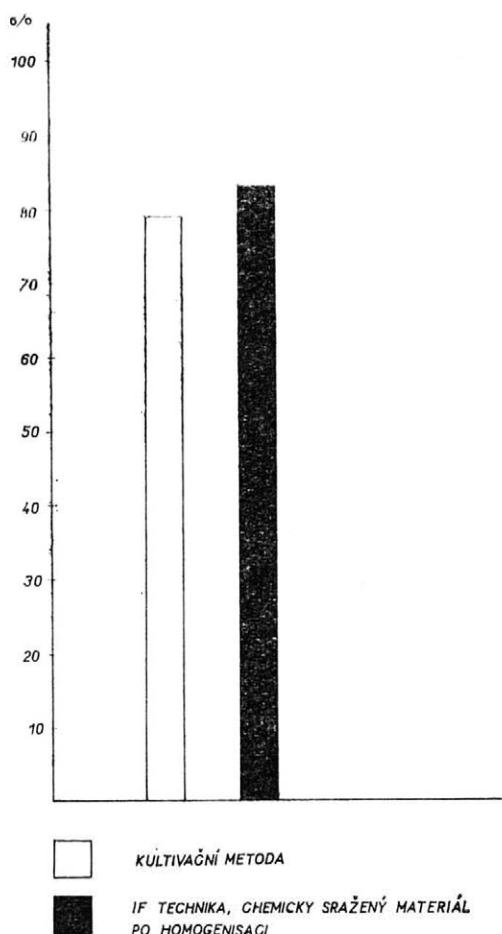
2. Záchyt salmonel rozšířenou kultivační metodou a nepřímou IF technikou z centrifugovaného materiálu po homogenizaci

VÝSLEDKY A DISKUSE

Obr. 1 znázorňuje srovnání záchytu salmonel rozšířenou kultivační metodou a imunofluorescenční technikou z otiskových preparátů; kultivací bylo při ní zachyceno 93,6 % pozitivních případů (levý sloupec) a imunofluorescenční technikou 59,4 % pozitivních případů (pravý sloupec). Vyšetřeno bylo 208 vzorků.

Obr. 2 srovnává záchyt salmonel rozšířenou kultivační metodou a imunofluorescenční technikou ze zhomogenizovaného materiálu; kultivací bylo při ní zachyceno 94,4 % pozitivních případů (levý sloupec) a imunofluorescenční technikou 65,1 % pozitivních případů (pravý sloupec). Takto bylo srovnáno 278 případů.

Obr. 3 vyjadřuje záchyt rozšířenou kultivační metodou a imunofluorescenční technikou chemickou cestou sraženého materiálu po jeho homogenizaci; kultivací bylo při ní zachyceno 79,2 % případů (levý sloupec) a imunofluorescenční technikou 33,4 % případů (pravý sloupec). Vyšetřeno bylo 35 případů. Rela-



3. Záchyt salmonel rozšířenou kultivační metodou a nepřímou IF technikou chemicky sraženého materiálu po homogenizaci

Nepřímou imunofluorescenční metodu jsme použili z důvodů praktických. Jak antisérum, tak i konjugát jsou v Československu komerčně dosažitelné, jsou skladovatelné, odpadá značení antiséra pomocí FITC, nutné pro přímou imunofluorescenční techniku, a barvitelnost je dobrá. Týchž dobrých výsledků při použití polyvalentního antiséra dosáhli Georgala, Boothroyd (1964) a Laramore, Moritz (1969).

Při srovnání tří uvedených metod je záchyt salmonel z otiskových preparátů barvených imunofluorescenční technikou relativně nízký, což odpovídá i nálezům sovětských autorů Larionova a Kuzmina (1959), kteří při negativním výsledku vyšetření inkubovali vzorek v termostatu po dobu pět až sedm hodin a vyšetření opakovali, nebo nálezům autorů Larionova, Zalesckij a Kuzmina (1960), kteří při negativním výsledku znovu vyšetřovali po šestihodinové až sedmihodinové inkubaci vzorků.

Na rozdíl od autorů Larionov, Zalesckij, Kuzmin (1960), kteří dělali otiskové preparáty po pěti sériích, jsme zhotovovali otiskové preparáty po třech sériích s ohledem na úsporu času a s vědomím, že metoda otisko-

tivně nízký záchyt pozitivních nálezů pomocí kulivační metody je vysvětlitelný nízkými objemovými dávkami salmonelové suspenze, aplikované pokusným zvířatům.

Záchyty salmonel pomocí imunofluorescenční techniky jsme srovnávali, jak bylo uvedeno, se záchyty salmonel zjištěnými rozšířenou kulivační metodou, u níž vidíme přísnější kritéria v rozšíření kultivace do dvou pomnožovacích pūd; kultivovali jsme jednak do pūdy Kauffmannovy, jednak i do doporučované pūdy se seleničitanem (Koudelka 1968; Silliker, Schmall, Chiu 1966; Heindrich 1963). Obě pomnožovací pūdy jsme inkubovali při 37 °C a při 43 °C (Georgala, Boothroyd 1964; Fievez a kol. 1967). Přísnější kritérium vidíme i v tom, že jsme z pomnožovacích pūd vyočkovávali po dobu čtyř dnů (Sedláček a kol. 1955). Touto metodou se zvýšila záchytnost salmonel přibližně o 4 % pozitivních nálezů ve srovnání se zhodnocením záchyty pouze z primokultivace a Kauffmannovy pūdy, inkubované při 37 °C, s následným vyočkováním na dvě selektivní pūdy po dobu dvou dnů. Další přísnější kritérium je v hodnocení preparátů barvených imunofluorescenční technikou — jako pozitivní byly hodnoceny pouze nálezy horizontálně situovaných tyčinek.

vých preparátů bez pomnožení mikroflóry ve vzorcích bude nevyhovující již proto, že v některých případech jsme v infikovaném materiálu nezjistili ani nejnížší kultivačně prokazatelný počet pěti salmonel v 1 g.

S ohledem na úsporu času vzhledem k vyšetřovací době jsme nechtěli inkubovat vzorky v pomnožovací půdě, jako např. Krupina, Ozerec (1966), kteří vzorky jatečného materiálu inkubovali v pomnožovací půdě po dobu čtyř hodin, centrifugovali a barvili IF technikou, avšak tato technika jim vždy nezaručila spolehlivou odpověď, nebo Demissie (1965), který kultivoval vodu před vyšetřením pomocí IF techniky přes noc v pomnožovací půdě, nebo i Georgala a Boothroyd (1964), kteří vyšetřovali IF technikou po pomnožení z pomnožovacích půd.

Pro předpokládanou nedostatečnou záchytnost sledované mikroflóry pomocí otiskových preparátů, kdy by bylo možno uvažovat o uspokojivých výsledcích pouze u silněji infikovaného materiálu, jsme současně barvili IF technikou po centrifugaci předem zhomogenizovaného materiálu.

Procento záchytů při této metodě je již vyšší než při metodě otiskových preparátů. Není však vhodná pro slabě infikovaný materiál, třebaže se nám vyskytly při jejím použití záchyty v případech, ve kterých výsledek vyšetření rozšířenou kultivační metodou byl negativní.

Proto jsme v poslední době použili techniku chemického sražení mikroflóry, popsanou v metodické části; průkaznost při ní je o 4,2 % vyšší ve srovnání a rozšířenou kultivační metodou; zároveň se nám touto metodou podařilo v několika případech záchyt, ačkoliv jsme v infikovaném materiálu nezjistili ani nejnížší kultivačně prokazatelný počet pěti salmonel v 1 g.

Marton, Geck, Jánossi (1966) pokládají pomocí IF techniky za prokazatelný počet 1000 zárodků salmonel a touto technikou měli větší záchyt než kultivací.

Naši metodu prověřujeme na dalších laboratorních zvířatech, u kterých jsou výsledky záchytů v relaci s výsledky uvedenými v tomto příspěvku. Metodu prověříme i na vzorcích masa a orgánů jatečných zvířat infikovaných přirozenou cestou salmonelami.

Definitivní výsledek vyšetření vzorků touto metodou je možno sdělit do dvou hodin po započatí práce v laboratoři. Vyšetření trvá u Larionova, Kuzmina (1959) 8 až 9 hodin, u Georgaly, Boothroyda (1964) 18 hodin, Demissie (1965) získá výsledek až druhý den.

Literatura

- DEMISSIE A., 1965, Imunofluorescence identifikation of Salmonella in faecal specimens. Acta path. et microbiol. scandinav. 65 : 271-286.
- FIEVEZ L., GRANDVILLE A., GHENNE P., DETROY P., NZUZI C., 1967, Présence de Salmonella dans les viandes de boeuf hachées de la région Bruxelloise. Ann. Méd. vétérin., Bruxelles, 111, 4 : 210-214.
- GEORGALA D. L., BOOTHROYD M., 1964, A rapid immunofluorescence technique in raw meat. J. hyg., Cambridge, 62, 3 : 319-327.
- HEINDRICH D., 1963, Vergleichende Untersuchungen mit Tetrathionatbouillon nach Bierbrauer und Selenitbrühe zum Nachweis von Salmonellen aus Kotproben vom Rind sowie bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Dtsch. tierärztliche Wsch. 70, 21 : 595-601.
- KOUDELKA J., 1968, Hodnocení použití pomnožovacích půd se seleničitanem, půdy Kauffmannovy a „Halle“ pro optimální záchyt salmonel. Sborník vědeckých prací Ústředního státního veterinárního ústavu, Praha. Kabinet veterinární osvěty 2 : 17-36.

- KRUPINA A. P., OZEREČ A. V., 1966, K ocenke metoda ljuveniscentnoj mikroskoppii dlja indikacii bakterij v mjase i mjasnych produktach. Voprosy pitanija 25, 5 : 63-69.
- LARAMORE C. R., MORITZ C. W., 1969, Fluorescent-antibody technique in detection of Salmonellae in animal feed and feed ingredients. Applied microbiology 17, 3 : 352-354.
- LARIONOV A. P., KUZMIN N. A., 1959, Obnaruženie vozбудitelej paratifožnych toksikoinfekcii s pomoščju fluorescirujuščich antitel. Veterinarija 35, 3 : 68-73.
- LARIONOV A. P., ZALESSKIJ L. P., KUZMIN N. A., 1960, Uskorennoje obnaruženie paratifožnych bakterij v mjase. Veterinarija 5 : 85-88.
- MARTON A., GECK P., JÁNOSSI G., 1966, Untersuchungen zur Anwendung der Immunofluoreszenz-Methode in der Lebensmittelbakteriologie. Zblt. Bakterioll., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg. 201, 4 : 511-514.
- SEDLÁK J. a kol., 1955, *Enterobacteriaceae* jako původci střevních nákaz a metody jejich laboratorní diagnostiky. SZN, Praha.
- SILLIKER J. H., SCHMALL A., CHIU J. Y., 1966, The fluorescent antibody technique as a means of detecting Salmonellae in foods. J. Food Sci. 31, 2 : 240-244.

Došlo dne 24. 9. 1970

TOMEŠ Z., GRUŠOVSKÁ B. (Военный научно-исследовательский ветеринарный институт, Прага-Мотол, Чехословакия). Улавливание салмонелл при помощи иммунофлуоресценции в сопоставлении с культивационным исследованием. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 303-309, 1971.

Описана улавливаемость салмонелл при помощи расширенного метода культивации и сопоставлена с улавливаемостью этих зародышей с помощью косвенной иммунофлуоресцентной техники на основе отпечаточных препаратов, седимента гомогенизованного и центрифугированного материала и препаратов, приготовленных на гомогенизованном, осажденном химическим путем и центрифугированном материале. Из этих 3 иммунофлуоресцентных методов наиболее эффективным представляется метод осаждения салмонелл химическим путем, когда преимуществом метода является повышенная улавливаемость салмонелл по сравнению с культивационным методом, а конечный результат исследования можно сообщить сроком до 2 часов после начала работ в лаборатории.

Иммунофлуоресценция салмонелл; сравнение методов приготовления препаратов для иммунофлуоресцентной техники

TOMEŠ Z., HRUŠOVSKÁ V. (Military Veterinary Research Institute, Prague - Motol, Czechoslovakia). *Salmonella Capture based on Immunofluorescence, in Comparison with Cultivation Examination*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 303-309, 1971.

The paper presents a description of the capture rate of Salmonellae as achieved with the widely used cultivation method in comparison with the capture rate of these germs obtained by the immunofluorescence method from print preparations, from homogenized and centrifuged sediment material, and from preparations based on homogenized material chemically precipitated and centrifuged. Considering these three immunofluorescence methods, the highest effectivity is attached to the chemical method of the condensing of Salmonellae. The advantage of this method is that the capture rate of the microorganisms is higher than in the cultivation method and that the result of the examination can be obtained two hours after the beginning of laboratory treatment.

immunofluorescence of Salmonellae; comparison of three methods of the production of preparations for immunofluorescence treatment

TOMEŠ Z., HRUŠOVSKÁ V. (Militärforschungsinstitut für Veterinärmedizin, Praha - Motol, Tschechoslowakei). *Salmonellenauffangen mittels Immunofluoreszenz im Vergleich zur Kultivierungsuntersuchung*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 303-309, 1971.

In der Arbeit wird das Auffangvermögen der Salmonellen mittels einer erweiterten Kultivierungsmethode im Vergleich zum Auffangvermögen dieser Keime mittels der

indirekten Immunofluoreszenztechnik von Abdruckpräparaten, vom Sediment des homogenisierten und zentrifugierten Materials und von den aus homogenisiertem, auf chemischem Wege gefälltem und zentrifugiertem Material angefertigten Materialien beschrieben. Von diesen drei Immunofluoreszenzmethoden scheint die Methode der Salmonellenfällung auf chemischem Wege die wirksamste zu sein; der Vorteil dieser Methode ist ein höheres Auffangvermögen der Salmonellen als bei der Anwendung der Kultivierungsmethode, und das Resultat der Untersuchung kann innerhalb von zwei Stunden nach Beginn der Arbeit im Laboratorium mitgeteilt werden.

Salmonellenimmunofluoreszenz; Vergleich der drei Verfahren der Präparateherstellung für die Immunofluoreszenzmethode

Adresa autorů:

MVDr. Z. Tomeš, MVDr. V. Hrušovská, Vojenský veterinární výzkumný ústav, Praha 5 - Motol, pú 56

Výběr z nových přírůstků
Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTI
na úseku veterinářství

Chabaud P. G. D 38.168/1969/6
La vitamine C dans le traitement des maladies virales du chien. Thèse devant la Fac. mixte de médecine et de pharmacie de Toulouse. Toulouse, École nation. vétér. 1969.
 (Tuberkulóza — léčení — výzkum)

Bedouet J. D 38.168/1969/5
Contribution à l'étude de l'utilisation de l'isoniazide dans la lutte contre la tuberculose bovine. Thèse devant la Fac. mixte de médecine et de pharmacie de Toulouse. Toulouse, École nation. vétér. 1969. 79 s. (Tuberkulóza — skot — léčení — izoniazid — výzkum)

D 34.131
Levkozata po govedata. Naučna sesija. 5. noevri 1968. Sofija, BAN 1970. 107 s. obr. tab. (Leukóza — skot — sborníky)

Neumann-Kurzke B. B. E 32.497/251
Mikroelektrophoretische Serumweißuntersuchungen an erwachsenen Rindern mit tumoröser lymphatischer Leukose. Inaug.-Diss. d. Tierärztl. Hochschule Hannover. Hannover, Klinik f. Rinderkrankheiten 1969. 34 s. 5 tab. (Leukóza — skot — krevní sérum — bílkoviny — vztahy — výzkum — metody mikroelektroforetické)

Vogel K. E 33.775/2
Leucoza, aviară. Sub aspectul tumorilor virale aviare. București. Inst. central de cercetări agricole, Centrul de documentare agricolă 1969. 81 s. 9 obr. 11 tab. Traducere Nr. 2. (Leukóza — drůbež — studijní zprávy)

Giordia H. C 17.756/53
Parasitism in cattle. Athens, Georgia oll. of agric. exp. stations 1969. 29 s. 7 tab. Research report 53. (Hlístice — cizopasníci — skot — brožury)

Kiene B. E 32.497/244
Die Wirksamkeit verschiedener Anthelmintika bei dem Capillaria obsignata. — Befall. Inaug.-Diss. d. Tierärztl. Hochschule Hannover. Hannover, Forschungsstation f. Geflügelkrankheiten 1968. 41 s. 1 obr. 9 tab. (Kapilarióza — drůbež — léčení — anthelmintika — výzkum)

Deltor J. C. Ch. D 38.168/1969/61
La méthyridine dans le traitement de la capillarirose aviaire (sa toxicité, son efficacité). Thèse devant la Fac. mixte de médecine et de pharmacie de Toulouse. Toulouse, École nationale vétér. 1969. 62 s. tab. (Kapilarióza — drůbež — léčení — methyridin — výzkum)

Bayard J. A. D 38.168/1969/10
Essai de traitement du téniasis du chien par le 14.015 R. P. Thèse devant la Fac. mixte de médecine et de pharmacie de Toulouse. Toulouse, École nation. vétér. 1969. 128 s. (Tasemnice — cizopasníci — pes — léčení — anthelmintika — 14.015 R. P. — výzkum)

N'Dao A. D 38.168/1969/15
La fasciolose bovine au Senegal. Thèse devant la Fac. mixte de médecine et de pharmacie de Toulouse. Toulouse, École nat. vétér. 1969. 83 s. (Motolice největší — cizopasník — skot — Senegal — výzkum)

NOVÝ ZPŮSOB ČIŠTĚNÍ BIOLOGICKÝCH EXTRAKTŮ PŘI STANOVENÍ REZIDUÍ CHLOROVANÝCH INSEKTICIDŮ

Z. Starý

Státní veterinární ústav, Plzeň

STARÝ Z. *Nový způsob čištění biologických extraktů při stanovení reziduí chlorovaných insekticidů.* Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 311-318, 1971.

Je popsán nový způsob purifikace biologických extraktů při stanovení reziduí CHI (chlorovaných insekticidů), využívající principu dvojnásobné kolonové chromatografie, který odstraňuje téměř veškeré balastní látky. Tím je umožněno maximální zahuštění výsledných přečištěných extraktů, aniž by docházelo k nežádoucí interferenci stopových nečistot s přítomnými CHI při plynové chromatografii a při chromatografii na tenkých vrstvách. Při použití plynové chromatografie s plamenným ionizačním detektorem byla zjištěna tato spodní mez stanovení: lindan — 2,5 ng, p,p'-DDT — 5 ng, obsažených v nástříkovém objemu 2,5 μ l. Analytický postup byl vyzkoušen pro stanovení reziduí lindanu a DDT jak v orgánech (játra, mozek), tak i v potravinách (sýr) s průměrnou výtěžností 96 % pro lindan a 88,4 % pro DDT při koncentraci lindanu 0,8 ppm a DDT 4,0 ppm ve všech uvažovaných materiálech. Zjištěná mez citlivosti — 0,04 ppm pro lindan a 0,08 ppm pro DDT — rovněž splňuje současné požadavky na kontrolu reziduí CHI v hygienických a toxikologických laboratořích. Přečištěných a příslušně zahuštěných extraktů lze použít i pro semikvantitativní vyhodnocení na tenkých vrstvách. Uvedený způsob purifikace je i časově nejméně náročný ve srovnání s ostatními používanými postupy.

lindan; DDT; purifikace reziduí; dvojnásobná kolonová chromatografie; plynová chromatografie

Stanovení reziduí chlorovaných insekticidů v různorodém biologickém materiálu je stále častěji vyžadováno jak v oboru toxikologické diagnostiky, tak při hodnocení nezávadnosti různých druhů potravin, především pak mléčných výrobků. Velmi důležitou etapu v celém analytickém postupu zaujímá purifikace biologických extraktů. Této otázce je věnována již řadu let značná pozornost, neboť na kvalitě přečištění biologického extraktu závisí možnost použití určité analytické techniky a s tím pak úzce souvisí otázka citlivosti analytického průkazu, jakož i otázka kvantitativního vyhodnocení reziduí v daném vzorku.

Mezi nejpoužívanější čistící postupy patří roztřepávání mezi dvě nemísitelné rozpouštědla, z nichž se nejvíc osvědčil různý poměr n-hexanu a acetonitrilu. V acetonitrilu se velká část CHI dobře rozpouští, zatímco současně vyextrahované látky zůstávají v hexanu. Při stanovení CHI v tucích byly ještě lepší výsledky dosaženy nahrazením acetonitrilu dimethylformamidem (de F a u b e r t M a u d e r a kol. 1964). Tento rozdělovací proces je ještě kombinován s čištěním na chromatografickém sloupci za použití aktivovaného kysličníku hlinitého. K odstranění tukových složek se také používá protřepání hexanového nebo CCl_4 -extraktu se směsí koncentrované kyseliny sírové a olea (1 : 1). Tento postup

lze ještě kombinovat s následnou chromatografií na sloupci Cellitu 545, impregnovaného směsí konc. kyseliny sírové a olea (Schechter a kol. 1945), nebo na sloupci silikagelu (Sergeant a Wood 1959, Wood 1960). Modifikované Schechterovy metody bylo použito i při našich metabolických pokusech s lindanem (Starý 1968), kdy jsme přechištovali především jaterní a mozkové extrakty. Použití směsi konc. kyseliny sírové a olea je možné jen u některých CHI (p,p'-DDT, lindan), u ostatních dochází k rozkladu. Ze stejných důvodů není možné odstranit tuky zmýdelněním vzhledem k nestálosti CHI v alkalickém prostředí. V poslední době se pak velmi často používá sloupce Florisilu především k odstranění lipidních látek (McKinley a kol. 1962, Moats 1963, Wood 1969).

Všechny takto přechištěné extrakty lze použít pro identifikaci CHI na tenkých vrstvách nebo metodou plynové chromatografie. Otázkou pouze zůstává, do jaké míry lze výsledné přechištěné extrakty zahustit, aby stopy doprovázejících nečistot neinterferovaly při vlastním analytickém stanovení (ve většině případů kvantitativním) a aby při tom byla zachována vysoká citlivost průkazu CHI. Z těchto důvodů a po vyzkoušení většiny uvedených postupů jsme přikročili k modifikaci metody podle Wooda (1969), která se ve své původní úpravě řadí do kategorie semimikroanalýz s využitím detektoru elektronového zachytu. Úkolem práce bude pak zhodnotit účinnost modifikovaného čistícího procesu v makropodmínkách, a to na základě aplikace několikanásobně zahuštěného výsledného extraktu na tenké vrstvy a na kolonu plynového chromatografu, vybaveného plamenovým ionizačním detektorem. Probrána bude také otázka mezní citlivosti, výtěžnosti a časové náročnosti celého analytického postupu.

MATERIÁL A METODY

Jako materiálu bylo použito při výzkumu této metodiky především jaterní a mozkové tkáně, z potravinářských produktů pak tvrdých sýrů, u nichž se nejčastěji vyžaduje kontrola na obsah CHI.

CHEMIKÁLIE

Dimetylsulfoxid, čistoty *p. a.*

Cellit 545 měl čistotu potřebnou k chromatografickým účelům

Na₂SO₄ bezvodý, čistoty *p. a.*

Hexan byl použit po redestilaci na zvláštní aparatuře

Florisil 60–100 mesh (úprava Florisilu pro náplň kolony: den před analýzou aktivujeme Florisil při teplotě 650 °C 4 hodiny, po vychladnutí ihned vsypeme do uzavřené lahvičky a dáme do exikátoru. Před naplňováním kolony deaktivujeme Florisil opatrným přidáváním 3,75 ml destilované vody k 21,25 g Florisilu za neustálého míchání. Deaktivovaným Florisilem ihned plníme hlavní kolonu).

Regenerace Florisilu: použitý Florisil z kolony se promyje pěti podíly destilované vody, každý podíl se dekantuje a Florisil se vysuší při teplotě kolem 80 °C a pak se vypaluje v muflové peci při 650 °C 8 hodin. Po vychladnutí se skladuje Florisil v uzavřených nádobkách až do doby použití.

Předkolonka (skleněná trubice na konci zúžená, bez kohoutku, 22 × 200 mm)

Hlavní kolona (skleněná trubice na konci uzavřená zábrusovým kohoutkem, 25 × 250 mm)

Bomba se stlačeným vzduchem

Elektrický vysoušeč vlasů

Rotační vakuová odparka nebo aparatura podle Kuderny — Danishe

Plynový chromatograf zn. Giede — GCHF — 18 — 3, místo výr. — NDR, vybavený plamenovým ionizačním detektorem. Kolona byla spirálová, kovová, délky 1 m, o průměru 4 mm, náplň kolony - nosič: Chromport XXX, zakotvená fáze: Fluorsilicon (DOW-FS-1265) (5 %), teplota dávkovacího prostoru — 220 °C, teplota kolony — 195 °C, průtok dusíku — 70 ml/min, tlak dusíku před kolonou — 1,65 kp/cm², tlak vodíku — 0,68 kp/cm², tlak vzduchu — 2,31 kp/cm², citlivost — 1/100 (maximální), posuv registračního papíru — 600 mm/hod, vstupní odpor — 10¹⁰ Ohmu.

Do dávkovacího prostoru bylo vždy aplikováno 2,5 μl desetkrát zahuštěného výsledného 2ml extraktu (viz pracovní postup a obr. 1–3). Plochy peaků byly vyhodnocovány planimetricky. Další podrobnosti o plynové chromatografii popisuje S t a r ý (1968).

Tenké vrstvy zn. „Silufol“ — mobilní fází byl hexan — jsme detekovali 0,5 % alkoholickým roztokem difenylaminu s následným ozářením v UV světle. Na start jsme nanášeli 10–20 μl dvacetkrát zahuštěného výsledného 2ml extraktu. Bylo zjištěno, že lze ještě detekovat 0,05 μg lindanu a 0,1 μg p,p'-DDT nanesených na chromatografický start. Polovinu těchto hodnot již nebylo možno detekovat.

PRACOVNÍ POSTUP

Principem metody je nejprve současná extrakce a hrubé přečištění vzorku, který je důkladně homogenizován s dimetylsulfoxidem (dále DMSO) a Cellitem. Obě tyto fáze — extrakce a hrubé přečištění — probíhají na malé předkolonce, vsunuté do hlavní čistící kolony, která je plněna Florisilem. Florisilová kolona pak slouží k dokonalé purifikaci vzorku.

Při vlastní analýze se naváží 5 g vzorku a v třecí misce se rozetře nejprve s 5 ml DMSO (5–10 min), po částech se přidává 12,5 g Cellitu 545 (ve třech podílech) a důkladně se vše promísí. Homogenizuje se asi 10 minut. Při delším roztírání by směs vlhla. Zvlhnutí by způsobovalo poruchy při chromatografii v předkolonce. Z třecí misky se kvantitativně přemísť veškerý materiál do předkolony za důkladného stlačování směsi a třecí miska (také použitý skalpel a tlouček) se vypláchne 2 ml DMSO, které se slíjí na povrch materiálu v předkolonce a nechají pod tlakem vsáknout (u sýrů se vypláchne třenka 4 ml DMSO). Po vsáknutí se napipetuje do předkolony 20 ml DMSO a pod tlakem se nechá pomalu vsakovat tekutina do materiálu tak, aby z předkolony vyteklo 9–10 ml DMSO extraktu (ne více!) za 15–20 minut — počítáno od doby, kdy se objeví první kapka. Ústí předkolony se umístí asi 4 cm nad povrchem náplně hlavní kolony.

Předem se připraví hlavní kolona takto:

Na dno hlavní kolony se dá chomáček čisté vaty, který se stlačí a na povrch se nasype asi v pěti dávkách 25 g deaktivovaného Florisilu. Každý podíl Florisilu se v koloně důkladně stlačí; když je vsypáno celé množství, oddělí se

vatou od 2cm vrstvy bezvodého síranu sodného také dobře stlačeného. Náplň kolony se uzavře asi 1cm vrstvou silně stlačené vaty. Celá náplň kolony se zvlhčí právě potřebným množstvím hexanu, který se teprve těsně před vykapáváním extraktu z předkolony nechá vsáknout do horní vaty a kohout hlavní kolony se uzavře. Po nakapání 9–10 ml DMSO extraktu z předkolony se předkolonka odstraní z prostoru hlavní kolony, otevře se kohoutek a DMSO extrakt se nechá za použití tlaku vsáknout do vrstvy bezvodého síranu sodného. Kohoutek se opět uzavře, hexan se z odpařovací misky umístěné pod ústím kolony vylije a teprve od tohoto okamžiku se začne zachytávat eluát. Florisil se promyje za použití tlaku 300 ml redestilovaného hexanu. Eluát se nechá vytékat rychlostí 5 ml/min. Po zachycení prvních přibližně 5 ml eluátu se započne s kontinuálním odpařováním roztoku na porcelánové misce tak, aby hladina eluátu v misce byla pokud možno na stejné výši, nebo jen nepatrně stoupala. Toho se dosáhne vhodným nastavením intenzity proudu vložného suchého vzduchu z elektrického vysoušeče vlasů. Po promytí kolony 300 ml redestilovaného hexanu se odpaří roztok v misce během několika minut téměř do sucha a miska se ihned kvantitativně vypláchne postupně několika malými podíly redestilovaného hexanu, které se slijí do zabroušené kalibrované zkumavky na 10 ml. Výsledný roztok se doplní vždy do objemu 2 ml. Tento roztok se pak zahušťuje v malých kónických zkumavkách ještě desetkrát (pro plynovou chromatografii), eventuálně dvacetkrát (pro chromatografii na tenkých vrstvách).

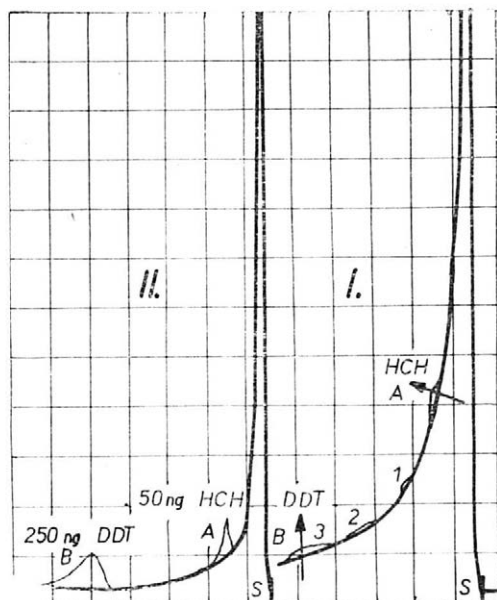
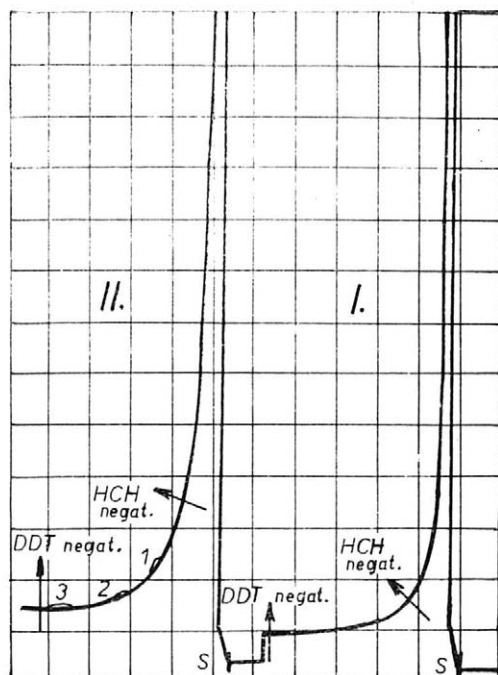
Pro zahuštění eluátu je z hlediska úspory rozpouštědel ještě výhodnější použít vakuové destilace nebo odpařovací aparatury podle Kuderny — Danishe.

Po promytí hlavní kolony 300 ml redestilovaného hexanu má být čelo DMSO stále viditelné nad spodním okrajem Florisilu, a to po celém obvodu kolony. Nesmí dojít ke vsakování DMSO do spodní vaty.

VÝSLEDKY A DISKUSE

U všech tří druhů zkoumaného materiálu (játra, mozek, sýry) byl dělán test výtěžnosti pro dva hlavní CHI — p,p'-DDT a lindan. Zároveň jsme se zabývali i otázkou mezní citlivosti, vyjádřené v jednotkách ppm, což vyžadovalo u všech druhů materiálu série slepých pokusů, aby bylo zřejmé, že nedochází k interferenci peaků stopových nečistot s hledanými peaky CHI. Na základě porovnání chodu zapisovače u každého slepého pokusu s chodem zapisovače u stejného slepého pokusu (předem důkladně zhomogenizovaného), ke kterému byly na počátku přidány CHI v množství charakterizujícím mezní citlivost, jsme získali hodnotitelný rozdíl v oblasti peaků příslušných CHI (jako příklad viz obr. 1 a 2). Navážky CHI pro zjištění mezní citlivosti byly voleny tak, aby ve 2,5 μ l desetkrát zahuštěného výsledného 2ml extraktu bylo v ideálním případě přítomno 5 ng lindanu, resp. 10 ng p,p'-DDT. Tak bylo zjištěno, že lze ještě v mezních případech prokázat 0,04 ppm lindanu a 0,08 ppm p,p'-DDT ve všech třech druzích zkoumaného materiálu. Teprve koncentrace reziduí pod uvedenými hranicemi by znemožňovala průkaz insekticidů tímto postupem. Nepatrné peaky stopových nečistot stanovení prakticky neruší, jak je patrné u uvedených chromatogramů. Ze série slepých pokusů je zřejmé, že detekované stopové nečistoty z určitého materiálu se objevují pravidelně u všech vzorků téhož materiálu, a to téměř ve stejném množství a charakterizované stejnými retenčními časy. Definovaná mezní citlivost je pro naše účely zcela postačující a není tudíž nezbytně nutné použít pro běžnou kontrolu detektoru

elektronového zachytu, uvážíme-li, že tolerance CHI v potravinách je v ČSSR pro DDT 1 ppm a pro lindan 2 ppm. S téměř stejnou citlivostí lze detekovat CHI i při použití chromatografie na tenkých vrstvách, která se tak stává velmi vhodnou kontrolní metodou. U každého zkoumaného materiálu bylo uděláno pět až sedm slepých pokusů a stejně tolik analýz prokazujících výše uvedenou mezní citlivost.



1. Slepý pokus — játra

I. 2,5 μ l čistého rozpouštědla (CCl_4)
II. 2,5 μ l extraktu z jater (slepý pokus) — v oblasti lindanu a DDT je lineární průběh

Šipky protínající linii zapisovače označují místo, kde by měl být vrchol peaku lindanu, resp. p,p' - DDT; S — start chromatografického záznamu; viz také další obrázky; zanedbatelné peaky stopových nečistot jsou označeny čísly 1, 2, 3

2. Mezní citlivost — játra

I. 2,5 μ l extraktu z jater (slepý pokus 1/II + 5 ng lindanu — A a 10 ng p,p' DDT — B); opět jsou viditelné peaky stopových nečistot (1, 2, 3) jako na 1/II

II. 2,5 μ l roztoku standardních látek (50 ng lindanu — A, 250 ng p,p' - DDT — B)

Výsledky testů výtěžnosti jsou uvedeny v tabulkách I, II a III. Z uvedených tabulek je zřejmé, že výtěžnost u obou nejužívanějších CHI je velmi dobrá; posuzujeme-li z tohoto hlediska popsanou metodu, lze říci, že svou výtěžností je na stejné úrovni s ostatními analytickými postupy, používajícími jiný způsob purifikace. Bylo také prokázáno, že výtěžnost není ovlivněna charakterem použitého materiálu. Testy výtěžnosti, uvedené v původní metodě podle Wooda (1969), poskytovaly stejné výsledky.

Velmi dobrá reprodukovatelnost celého analytického postupu je pak zřejmá z vypočtených variačních koeficientů pro každý jednotlivý insekticid: V_k (DDT) = 2,1 %, V_k (lindan) = 1,4 %.

I. Test výtěžnosti CHI přidanych do já-
terní tkáně

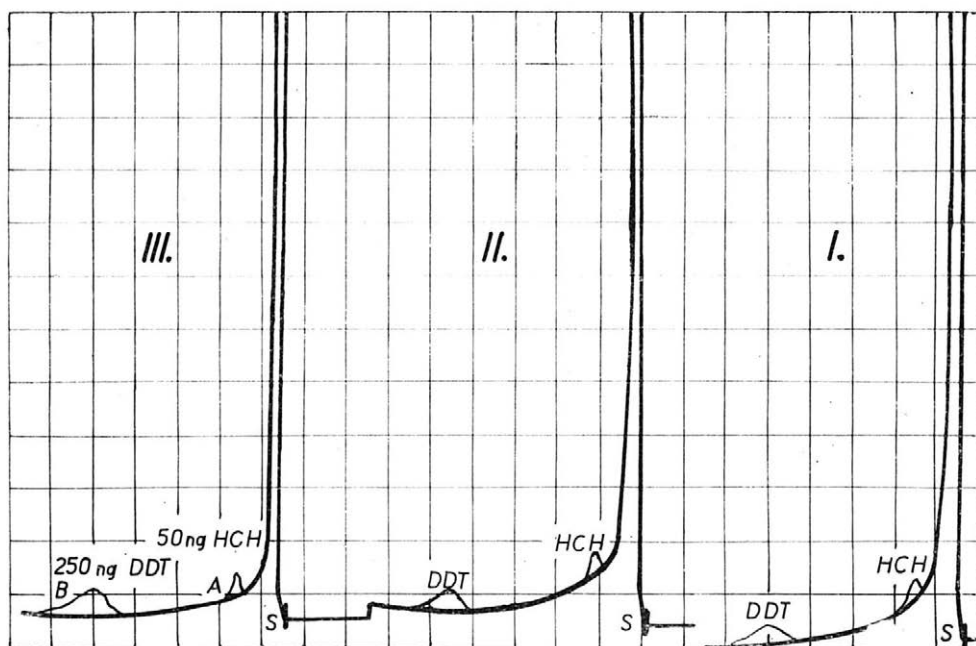
CHI	Koncentrace přidaného CHI (v ppm)	Výtěžnost (v %)
Lindan	0,8	96, 94, 96
p, p'- DDT	4,0	88, 87, 90

II. Test výtěžnosti CHI přidanych do
mozkové tkáně

CHI	Koncentrace přidaného CHI (v ppm)	Výtěžnost (v %)
Lindan	0,8	95, 94, 98
p, p'- DDT	4,0	90, 88, 85

III. Test výtěžnosti CHI přidanych do
sýrů

CHI	Koncentrace přidaného CHI (v ppm)	Výtěžnost (v %)
Lindan	0,8	97, 96, 97
p, p'- DDT	4,0	87, 90, 91



3. Test výtěžnosti — játra

I. 2,5 μ l extraktu z jater (slepý pokus + 50 ng lindanu a 250 ng p,p' — DDT —
udané množství CHI odpovídá ideálnímu případu 100% výtěžnosti)

II. stejný vzorek jako u I

III. 2,5 μ l roztoku standardních látek (50 ng lindanu — A, 250 ng p,p' — DDT — B);
srovnaj plochy peaků s I nebo II

Pokud se koncentrace CHI ve vzorku blíží k hodnotám mezní citlivosti (kolem 0,08 ppm), není kvantitativní vyhodnocení tak přesné, jako je tomu u vyšších koncentrací, kdy peaky chlorovaných insekticidů jsou zřetelnější. Přesto však lze říci, že vykazuje-li chod zapisovače lineární průběh v oblasti peaků příslušných CHI, nemůže v žádném případě koncentrace těchto CHI ve vzorku překročit hodnotu 0,08 ppm, jak vyplývá ze všech uvedených chromatogramů. Pokud by bylo nutné přesně kvantitativně vyhodnotit koncentrace nižší než 0,08 ppm, bylo by třeba použít detektoru elektronového záchytu. Takové případy však v běžné praxi nepřicházejí v úvahu.

Z hlediska časové náročnosti přináší pak uvedený analytický postup podstatné urychlení celé procedury. V průměru lze říci, že tento postup zkracuje dobu analýzy na čtvrtinu v porovnání s běžně používanými metodami, jako je roztrpávání mezi dvě nemísící se rozpouštědla, kombinované obvykle ještě se sloupcovou chromatografií.

Za technickou spoluprací děkuji H. Kantové.

Literatura

- FAUBERT MAUNDER M. J., EGAN H., GODLY E. W., HAMMOND E. W., RO-BURN J., THOMSON J., 1964, Clean-up of animal fats and dairy products for the analysis of chlorinated pesticide residues. *Analyst* 89 : 168-174.
- MC KINLEY W. P., SAVARY G., WEBSTER C., 1962, Procedure for the purification of fat samples prior to analyses for DDT, DDE and rhothane. *J. Agric. Food Chem.* 10 : 226-229.
- MOATS W. A., 1963, One-step chromatographic cleanup of chlorinated hydrocarbon pesticide residues in butterfat. II. Chromatography on Florisil. *J. Assoc. Off. Agr. Chem.* 46 : 172.
- SCHECHTER M. S., SOLOWAY S. B., HAYES R. A., HELLER H. L., 1945, Colorimetric determination of DDT. *Ind. Eng. Chem.* 17 : 704.
- SERGEANT G. A., WOOD R., 1959, The determination of DDT residues in food-stuffs. *Analyst* 84 : 423-427.
- STARÝ Z., 1968, Metabolismus, biochemické aspekty a analytická problematika při intoxikacích makroorganismů lindanem a DDT. Kandidátská disertační práce, Vysoká škola veterinární, Brno.
- WOOD N. F., 1969, Extraction and clean-up of organochloride pesticide residues by column chromatography. *Analyst* 94 : 399-405.
- WOOD R., 1960, The determination of hexachlorocyclohexane residues in food-stuffs. *Analyst* 85 : 21-25.

Došlo dne 25. 9. 1970

СТАРЫ З. (Государственный ветеринарный институт, Пильзен, Чехословакия). Новый способ очистки биологических экстрактов при определении остаточных последствий хлорированных инсектицидов. *Vet. Med. (Praha)* 16 (5) : 311-318, 1971.

Описан новый способ пурификации биологических вытяжек при установлении остаточных последствий CHI (хлорированных инсектицидов), основанный на принципе удвоенной колонной хроматографии и практически устраняющий любые баластные вещества. Это позволяет максимальную загрузку результирующих очищенных экстрактов и не допускает нежелательной интерференции нечистот следа с CHI при газовой хроматографии и на тонких слоях. При применении газовой хроматографии с пламенным ионизирующим устройством установлена следующая нижняя граница: линдан — 2,5 нг; р,р-ДДТ — 5 нг, содержащихся в шприцевочном объеме 2,5 μ л. Аналитический прием испытан в ходе определения остаточного последствия линдана и ДДТ как в органах (печени, мозге), так и в пище (сыре) со средним выходом 96 % у линдана и 88,4 % у ДДТ при концентрации $0,8 \cdot 10^{-6}$ для линдана и $4,0 \cdot 10^{-6}$ для ДДТ во всех материалах. Этот предел чувствительности отвечает также современным требованиям к контролю остаточных последствий

СНІ в гигиенических и токсикологических лабораториях. Прочищенные и соответствующим способом загущенные экстракты можно применять и для полуквантитативного определения тонких слоев. Описанный способ пурификации требует меньше времени, чем все остальные приемы.

линдан; ДДТ; пурификация остаточных последствий; удвоенная колонная хроматография; газовая хроматография

STARÝ Z. (State Veterinary Institute, Plzeň, Czechoslovakia). *A New Method of the Purification of Biological Extracts in the Determination of the Residues of Chlorinated Insecticides*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 311-318, 1971.

The paper presents a description of a new method of the purification of biological extracts in the determination of the residues of CI (chlorinated insecticides); the method is based on the principle of double column chromatography which removes practically all ballast. This allows for maximum thickening of the resulting purified extracts with the exclusion of the undesirable interference of trace impurities with the present CI in gas chromatography and in thinlayer chromatography. In the use of gas chromatography with flame ionizing detector, the following lower limits of determination were obtained: lindan — 2.5 ng, p,p-DDT — 5 ng, contained in the feed volume of 2.5 μ l. The analytical procedure was checked for the determination of the residues of lindan and DDT both in organs (liver, brain) and in foodstuffs (cheese) with average dressing percentage reaching 96 % for lindan and 88.4 % for DDT at concentrations of 0.8 ppm for lindan and 4.0 ppm for DDT, in all of the materials under study. The determined limit sensitivity — 0.04 ppm for lindan and 0.08 ppm for DDT — also meets the existing requirements for the control of CI residues in hygienic and toxicological laboratories. The purified and adequately thickened extracts can be used also for the semiquantitative evaluation in thin layers. The described method of purification requires less time, in comparison with other procedures used.

линдан; ДДТ; purification of residues; double column chromatography; gas chromatography

STARÝ Z. (Staatliches Veterinärinstitut, Plzeň, Tschechoslowakei). *Neue Reinigungsart der biologischen Extrakte bei der Residuenbestimmung der chlorierten Insektiziden*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 311-318, 1971.

Es wird die neue Purifikationsart der biologischen Extrakte bei der Residuenbestimmung der chlorierten Insektiziden, die das Prinzip der doppelten Säulenchromatographie, das praktisch sämtliche Ballaststoffe beseitigt, beschrieben. Dadurch wird die maximale Verdickung der raffinierten Folgeextrakte ermöglicht, ohne daß es zur unerwünschten Interferenz der Spurenunreinlichkeiten mit den anwesenden chlorierten Insektiziden bei der Gaschromatographie und bei der Chromatographie auf schwachen Schichten kommt. Bei der Anwendung der Gaschromatographie mit Flammenionisierungsdetektor wurde folgende untere Bestimmungsgrenze festgestellt: Lindan — 2,5 ng, p,p-DDT — 5 ng, im Spritzvolumen enthaltene 2,5 μ l. Der analytische Prozeß wurde für die Residuenbestimmung des Lindans und DDT wie in den Organen (Leber, Gehirn), so auch in den Lebensmitteln (Käse) mit durchschnittlichem Ertrag von 96 % für Lindan und 88,4 % für DDT bei einer Konzentration des Lindans von 0,8 ppm und des DDT 4,0 ppm in sämtlichen erwogenen Materialien geprüft. Die festgestellte Grenzemfindlichkeit — 0,04 ppm für Lindan und 0,08 ppm für DDT — erfüllt ebenfalls die gegenwärtigen Anforderungen auf die Residuenkontrolle der chlorierten Insektiziden in den hygienischen und toxikologischen Laboratorien. Die raffinierten und entsprechend verdickten Extrakte können auch für die semiquantitative Bewertung auf schwachen Schichten angewandt werden. Die angeführte Purifikationsart ist auch zeitgemäß am wenigsten anspruchsvoll im Vergleich zu den anderen angewandten Vorgängen.

Lindan; DDT; Residuenpurifikation; doppelte Säulenchromatographie; Gaschromatographie

Adresa autora:

RNDr. Z. Starý, CSc., Státní veterinární ústav, Plzeň, Družstevní 13

ARYLAMIDÁZOVÁ AKTIVITA V NIEKTORÝCH ORGÁNOCH KURČIAT

J. Blahovec, K. Blahovcová, M. Bartík

Vysoká škola veterinárska, katedra chémie, biochémie a toxikológie, Košice

BLAHOVEC J., BLAHOVCOVÁ K., BARTÍK M. *Arylamidázová aktivita v niektorých orgánoch kurčiat*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 319-327, 1971.

Zisťovali sme aktivity arylamidázových enzýmov v srdci, pečeni, slezine, ľadvinách, mozgu, svalu, pankrease a v krvnom sére kurčiat. Aktivitu enzýmov sme stanovovali k chromogénnym syntetickým substrátom L-leucyl-p-nitroanilidu, L-lyzyl-p-nitroanilidu a glycyl-p-nitroanilidu. Zistili sme, že prevažná časť aktivity je lokalizovaná vo všetkých orgánoch v rozpustných bielkovinových frakciách (supernatanty nad 106 000 g) s výnimkou enzýmov, štiepiacich L-leucyl-p-nitroanilid, v supernatantoch pečene a ľadvín, kde hlavne v prípade ľadvín je aktivita viazaná na nerozpustné bunčné štruktúry. Enzýmy v jednotlivých orgánoch sú senzitivnejšie k báziickému substrátu L-lyzyl-p-nitroanilidu, pričom hydrolýza glycyl-p-nitroanilidu bola zjavne najpomalejšia. Optimálne pH účinku arylamidázových enzýmov vo fosfátových pufoch pre všetky tri substráty má hodnotu 7,5, pričom bol pozorovaný vzrast aktivity pre koncentráciu 0,2 M v oblasti pH optima. Optimálne pH účinku enzýmov, inkubovaných v Tris/HCl pufoch, pre substrát L-lyzyl-p-nitroanilid je v oblasti pH 7,0 a pre L-leucyl-p-nitroanilid a glycyl-p-nitroanilid je posunuté k alkalickjším hodnotám (pH 8,0). Prítomnosť dvojmocných kationtov Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} o koncentrácii 10^{-3} M mala za následok pokles enzymatickej aktivity, ktorý bol výrazný hlavne v prípade Zn^{2+} a Cd^{2+} . Podobný účinok na aktivitu enzýmov mala kyselina etyléndiamíntetraoctová.

arylamidázové enzýmy; orgánová aktivita; kura

V predchádzajúcom článku (Bartík, Blahovec 1971) sme sa zaoberali arylamidázovými enzýmami z hľadiska ich distribúcie do subcelulárnych frakcií pečene a ľadvín, v ktorých boli tieto enzýmy nájdené v najväčších koncentráciách. V literatúre nachádzame bohaté údaje o výskyte a vlastnostiach týchto enzýmov aj v iných orgánoch rôznych druhov cicavcov (Mäkinen, Hopsu 1967b, Rehfeld a kol. 1967), no doposiaľ chýbajú takmer úplne vedomosti o zastúpení a vlastnostiach arylamidázových enzýmov u hydiny. Z tohoto dôvodu sme si postavili za cieľ stanoviť a navzájom porovnať zastúpenie týchto enzýmov v rôznych orgánoch zdravých kurčiat, určiť optimálne podmienky ich hydrolyzačnej činnosti a vyskúšať vplyv niektorých dvojmocných kationtov a kyseliny etyléndiamíntetraoctovej na aktivitu týchto enzýmov.

MATERIÁL A METÓDY

Do pokusu sme vzali päť kurčiat (60 dní staré) plemena New Hampshire. Krv bola odobraná zo žily, sérum sa oddelilo státim po 12 hodinách pri laboratórnej teplote. Po usmrtení zvierat dekapitáciou boli vybraté orgány a ihneď

uložené do predchladeného roztoku 0,05 M Tris/HCl pufru o pH 7,1.

Enzymatickú aktivitu sme stanovovali k substrátom L-leucyl-p-nitroanilid, L-lyzyl-p-nitroanilid a glycyl-p-nitroanilid. Substráty, s výnimkou L-lyzyl-p-nitroanilidu, sú ťažko rozpustné vo vode, a preto boli ich 0,025 M roztoky pripravené v acetóne.

PRÍPRAVA TKANIVOVÝCH HOMOGENÁTOV

Všetky orgány s výnimkou mozgu, svalu a pankreasu boli pokrúpané na tenké plátky a za účelom odstránenia krvi premývané predchladeným roztokom 0,05 M Tris/HCl pufru o pH 7,1. Rovnaké váhové diely každého orgánu z piatich kurčiat boli spojené a homogenizované nožovým homogenizátorom v štvornásobnom objeme Tris/HCl pufru o pH 7,1. Všetky homogenáty až do použitia boli uskladnené v chladničke pri 0–2 °C (24–48 hod).

CENTRIFUGÁCIA

K príprave supernatantových frakcií každého orgánu sme použili ultracentrifugácie pri 106 000 g po dobu 60 min pri 2 °C na preparatívnej ultracentrifúge VAC 60 Janetzki. Rozpustné supernatantové frakcie sme po centrifugácii odobrali injekčnou striekačkou a až do použitia skladovali ako homogenáty.

URČENIE ARYLAMIDÁZOVEJ AKTIVITY

Podmienky stanovenia a vyjadrenia enzymatických aktivít homogenátov a supernatantov jednotlivých orgánov a séra boli popísané v predchádzajúcom článku (Bartík, Blahovec 1971). Inkubačná doba sa pohybovala od 30 do 60 min.

VÝSLEDKY A DISKÚSIA

AKTIVITY ARYLAMIDÁZ V ORGÁNOCH A KRVNOM SÉRE

Cieľom našich experimentov bolo stanovenie a vzájomné porovnanie koncentrácií arylamidázových enzýmov v sére a v rôznych vnútorných orgánoch kurčiat. V našich pokusoch sme určovali aktivity arylamidázových enzýmov k trom chromogénnym substrátom, a to k L-leucyl-p-nitroanilidu, L-lyzyl-p-nitroanilidu a glycyl-p-nitroanilidu, pričom aktivity boli vždy stanovené pre homogenát a rozpustnú supernatantovú frakciu srdca, pečene, sleziny, ľadvín, mozgu, svalu, pankreasu a porovnané s aktivitou arylamidázových enzýmov v sére. Hodnoty týchto aktivít k jednotlivým substrátom sú uvedené v tabuľke I.

Podobné experimenty, sledujúce rozloženie arylamidázových enzýmov v rôznych orgánoch krýs, prevádzali Nachlas a kol. (1962). Autori určovali aktivity k aminokyselinovým derivátom β -naftylamínu a v zhode s našimi výsledkami našli, že aktivita homogenátov kryšej pečene, ľadvín, čreva a mozgu k substrátu glycyl- β -naftylamidu bola najmenšia. Ďalej uvádzajú, že enzýmy homogenátov ľadvín boli k bázičnému substrátu L-arginyl- β -naftylamidu menej aktívne, ako k L-leucyl- β -naftylamidu, pričom v prípade homogenátov pečene a mozgu bolo tomu naopak. Malé aktivity k substrátu glycyl-p-nitroanilidu boli nájdené aj v niektorých orgánoch človeka (Rehfeld a kol. 1967). Vysoké aktivity arylamidázových enzýmov, stanovovaných k rôznym aminokyseli-

I. Aktivita arylamidázových enzýmov v jednotlivých orgánoch a krvnom sére kurčiat — enzymatická aktivita bola stanovená k substrátom L-leucyl-p-nitroanilidu, L-lyzyl-p-nitroanilidu a glycyl-p-nitroanilidu

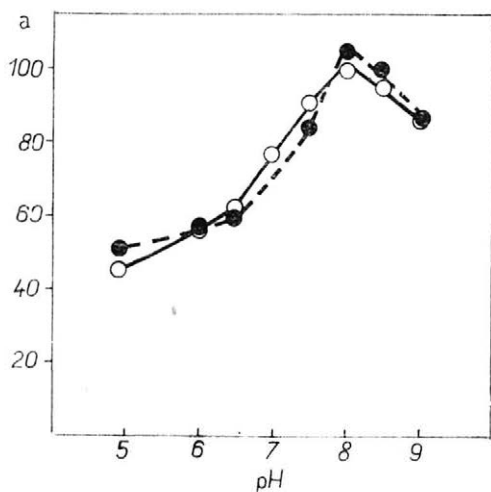
Orgán	L-leucyl-p-nitro-anilid		L-lyzyl-p-nitro-anilid		Glycyl-p-nitro-anilid	
	aktivita v μ M p-nitroanilínu/mg bielkovinného N/hod. pri 37 °C					
	homo-genát	super-natant	homo-genát	super-natant	homo-genát	super-natant
Srdce	65,0	220,0	81,0	360,0	18,0	109,0
Pečeň	130,0	110,0	220,5	347,5	50,0	62,0
Slezina	109,0	164,0	136,0	362,0	21,5	100,0
Čadviný	224,0	77,5	194,0	242,0	80,0	81,0
Mozog (celý)	39,0	132,0	41,0	215,0	9,0	64,0
Sval (<i>musc. cand. illio flexorius</i>)	35,5	70,0	55,0	118,0	25,5	63,0
Pankreas	56,5	83,5	103,0	163,0	11,0	58,0
Sérum		108,0		48,5		46,5

novým derivátom β -naftylamínu, v krvných sérach sliepok našli Nagatsuo a kol. (1968), ktorí zistili, že aktivita sérových enzýmov k substrátu L-leucyl- β -naftylamidu je väčšia, ako k substrátom L-lyzyl- a glycyl- β -naftylamidu. Podobné zistenie bolo nájdené aj nami (viď tabuľku I).

Z našich výsledkov a z citovanej literatúry sa dá predpokladať, že arylamidázové enzýmy tvoria skupinu enzýmov, rozšírených pravdepodobne vo všetkých orgánoch sliepok. Väčšina týchto enzýmov bude viazaná na rozpustné cytoplazmatické bielkovinné frakcie, no u niektorých orgánov, usudzujúc z vyššej špecifickej aktivity ich homogenátov, budú pravdepodobne tieto enzýmy viazané na nerozpustné bunecné partikule, z ktorých pri uvedených podmienkach homogenizácie do supernatantovej frakcie neprechádzajú.

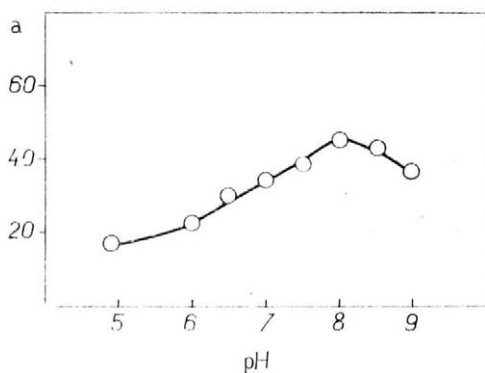
pH OPTIMUM, VPLYV RÔZNYCH KONCENTRÁCIÍ TRIS/HCl PUFROV A FOSFÁTOVÝCH PUFROV A ÚČINOK NIEKTORÝCH DVOJMOCNÝCH KATIONTOV A KYSELINY ETYLÉNDIAMÍNTETRAOCTOVEJ

Aby sme bližšie určili niektoré vlastnosti nami sledovaných arylamidázových enzýmov, prešetrili sme závislosti aktivity týchto enzýmov na rôznych hodnotách pH. Za týmto účelom sme inkubovali enzýmy supernatantovej frakcie pečene so substrátmi L-leucyl-p-nitroanilidom, L-lyzyl-p-nitroanilidom a glycyl-p-nitroanilidom vo fosfátových a Tris/HCl pufoch. Inkubácia prebiehala pre fosfátové pufo v rozmedzí pH hodnôt od 5,7 do 8,0 a koncentrácie 0,2 M, 0,1 M a 0,05 M a pre Tris/HCl pufo od pH 5,0 do pH 9,0 a koncentrácie 0,1 M a 0,05 M. Ako je vidieť z obrázkov 1 a 2, nájdené optimálne pH v Tris/HCl pufoch pre substráty L-leucyl-p-nitroanilid a glycyl-p-nitroanilid je rovnaké a leží v oblasti pH 8,0. Na druhej strane pH optimum účinku enzýmov štiepiacich bázičky substrát L-lyzyl-p-nitroanilid je posunuté do neutrálnej oblasti s maximom pri pH 7,0 (obr. 3). pH krivka enzymatickej akti-

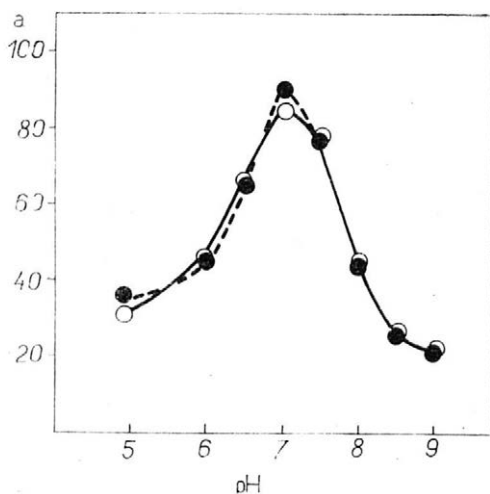


1. Účinok rôznych hodnôt pH Tris/HCl pufrov na enzymatickú hydrolýzu L-leucyl-p-nitroanilidu enýmami supernatantovej frakcie kuracej pečene
a = aktivita v μM p-nitroanilínu za 60 min

● --- ● 0,05 M Tris/HCl
○ — ○ 0,10 M Tris/HCl



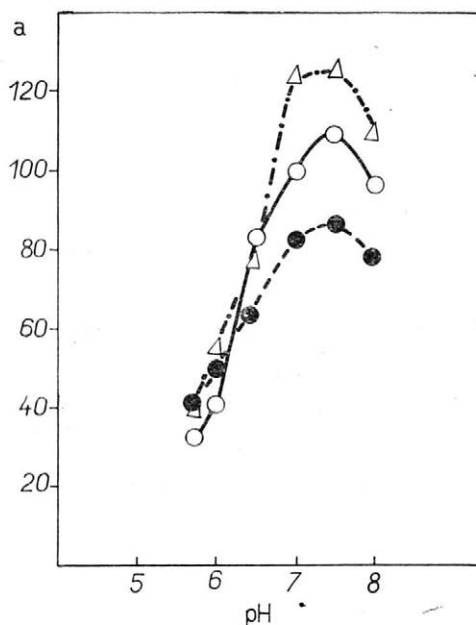
2. Účinok rôznych hodnôt pH 0,1 M Tris/HCl pufrov na enzymatickú hydrolýzu glycyl-p-nitroanilidu enýmami supernatantovej frakcie kuracej pečene
a = aktivita v μM p-nitroanilínu za 90 min



3. Účinok rôznych hodnôt pH Tris/HCl pufrov na enzymatickú hydrolýzu L-lyzyl-p-nitroanilidu enýmami supernatantovej frakcie kuracej pečene
a = aktivita v μM p-nitroanilínu za 30 min

● --- ● 0,05 M Tris/HCl
○ — ○ 0,10 M Tris/HCl

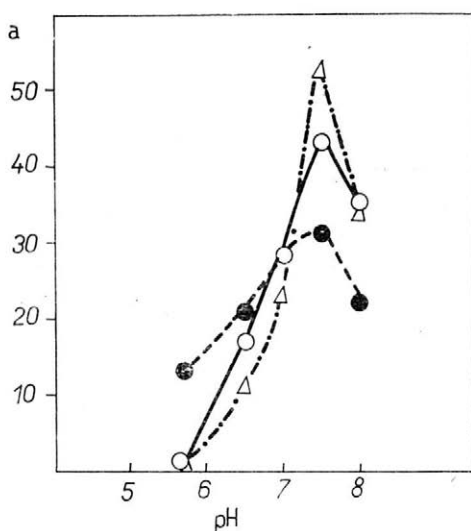
vity k tomuto substrátu sa od predchádzajúcich dvoch (substrát L-leucyl- a glycyl-p-nitroanilid) liši rýchlym poklesom aktivity smerom k alkalickjším hodnotám pH, pričom v okolí pH 9,0 - na rozdiel od predchádzajúcich - prebieha hydrolýza pomalšie. V literatúre nachádzame podobný priebeh aktivity v závislosti na pH pre arylamidázové enzýmy hovädzej hypofýzy, ktorých aktivita bola určená k neutrálnemu substrátu L-leucyl-p-nitroanilidu a k bázičným substrátom L-lyzyl- a L-arginyl-p-nitroanilidom v dimetylglutarátových a Tris/HCl pufroch (Ellis, Perry 1966). Optimálne pH pre L-leucyl-p-nitroanilid bolo v rozmedzí hodnôt 7,5 až 8,0, zatiaľ čo pre oba bázičné substráty bola aktivita najvyššia v oblasti pH 7,0. Mäkinen a Hopsu (1967a) uvádzajú, že enzýmy supernatantu kryšej pečene, ktorých aktivita bola určená v 0,1 M Tris/HCl pufroch k substrátu L-arginyl- β -naftylamidu, majú optimálne pH v rozmedzí hodnôt od 6,3 do 7,0.



4. Účinok rôznych hodnôt pH fosfátových pufov na enzymatickú hydrolýzu L-leucyl-p-nitroanilidu enzýmami supernatantovej frakcie kuracej pečene

a = aktivita v μM p-nitroanilínu za 60 min

Δ. - . - Δ 0,20 M fosfátový pufer
○ — ○ 0,10 M fosfátový pufer
● - - ● 0,05 M fosfátový pufer



5. Účinok rôznych hodnôt pH fosfátových pufov na enzymatickú hydrolýzu glycyl-p-nitroanilidu enzýmami supernatantovej frakcie kuracej pečene

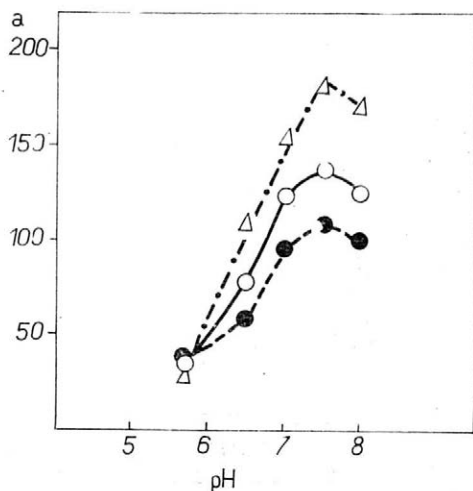
a = aktivita v μM p-nitroanilínu za 90 min

Δ. - . - Δ 0,20 M fosfátový pufer
○ — ○ 0,10 M fosfátový pufer
● - - ● 0,05 M fosfátový pufer

6. Účinok rôznych hodnôt pH fosfátových pufov na enzymatickú hydrolýzu L-lyzyl-p-nitroanilidu enzýmami supernatantovej frakcie kuracej pečene

a = aktivita v μM p-nitroanilínu za 30 min

Δ. - . - Δ 0,20 M fosfátový pufer
○ — ○ 0,10 M fosfátový pufer
● - - ● 0,05 M fosfátový pufer



Priebeh hydrolytického štiepenia nami sledovaných substrátov vo fosfátových pufoch o koncentráciách 0,2 M, 0,1 M a 0,05 M je odlišný. Z obrázkov 4, 5 a 6 je vidieť, že optimálne pH pre všetky tri substráty je rovnaké a leží v slabo alkalicknej oblasti, okolo pH 7,5. Na rozdiel od Tris/HCl pufov bola pozorovaná vo všetkých prípadoch zjavná aktivácia týchto enzýmov v pufoch o vyššej koncentrácii. Závislosť hydrolýzy bázičného substrátu L-arginyln- β -naphthylamidu enzýmami kryšej pečene na pH hodnotách rôznych pufov robili H o p s u a kol. (1966). Podobne ako v našom prípade, pozorovali autori rozdiely v hodnotách optimálneho pH v 0,1 M fosfátových a 0,1 M Tris/HCl pufoch.

II. Účinok kovových iónov a kyseliny etyléndiamíntetraoctovej na aktivitu arylamidázových enzýmov v supernatantovej frakcii kuracej pečene — všetky kovy boli pridané vo forme chloridov tak, aby konečná koncentrácia v inkubačnom objeme bola 10^{-5} M — v tejto koncentrácii bola pridaná aj kyselina etyléndiamíntetraoctová

Pridaný kov	Rýchlosť hydrolýzy*)	
	L-leucyl-p-NA	L-lyzyl-p-NA
Žiadny	100	100
Mn ²⁺	84	110
Mg ²⁺	98	116
Ni ²⁺	65	87
Co ²⁺	91	105
Zn ²⁺	19	40
Ca ²⁺	89	110
Cd ²⁺	15	23
EDTA	26	26

Vysvetlivky: -p-NA = p-nitroanilid

EDTA = kyselina etyléndiamíntetraoctová

*) rýchlosť hydrolýzy bez pridaného kovu = 100;
ostatné rýchlosti boli k tejto hodnote prepočítané

Arylamidázové enzýmy patria do skupiny aminopeptidáz, ktorých aktivita je značne ovplyvnená prítomnosťou niektorých ťažkých kovov. Sú napr. dobre známe značné aktivačné účinky divalentných katiónov horčíku a mangánu na aktivitu leucínaminopeptidázy (S m i t h, S p a c k m a n 1955). V našich pokusoch sme chceli vyskúšať aktivačné, alebo inhibičné účinky viacerých dvojmocných katiónov a účinok kyseliny etyléndiamíntetraoctovej ako chelátotvorného činidla. V tabuľke II sú uvedené aktivity enzýmov supernatantu kuracej pečene k substrátom L-leucyl-p-nitroanilidu a L-lyzyl-p-nitroanilidu v prítomnosti Mn²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Cd²⁺ a kyseliny etyléndiamíntetraoctovej. Z výsledkov v tabuľke je vidieť, že vplyv kovových iónov na aktivitu enzýmov štiepiacich L-leucyl- a L-lyzyl-p-nitroanilidy je rôzny. Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ a Ca²⁺ prakticky aktivitu k oboj substrátom neovplyvňujú, alebo ju menia len veľmi málo. Na druhej strane prítomnosť Ni²⁺, Zn²⁺ a Cd²⁺ aktivitu značne znižuje. Podobný inhibičný účinok mala aj kyselina etyléndiamíntetraoctová. Literárne údaje týkajúce sa aktivácie a inhibície enzýmov štiepiacich chromogénne substráty dvojmocnými kovmi a kyselinou etyléndiamíntetraoctovou sa v niektorých prípadoch rozchádzajú. Tak napr. F l e i s h e r

a kol. (1964) pre ľudské sérové arylamidázové enzýmy uvádzajú, že prítomnosť Mn^{2+} a Zn^{2+} je bez účinku na aktivitu, zatiaľ čo ióny Co^{2+} aktivitu zvyšujú. Burstone a Folk (1956) zistili, že arylamidázová aktivita opicej a krysej pečene, ľadvín, pankreasu, sleziny a čreva je prakticky kompletne inhibovaná iónami Cu^{2+} , Pb^{2+} a Cd^{2+} . Na druhej strane prítomnosť Co^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} a Mg^{2+} aktivitu enzýmov v uvedených orgánoch neovplyvňovala. Iné údaje uvádzajú Green a kol. (1955), ktorí našli, že enzýmy homogenátu kryších ľadvín sú úplne inhibované Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} a Cd^{2+} . Ióny Mn^{2+} a Mg^{2+} aktivitu inhibovali čiastočne. Marks a kol. (1967, 1968) pozorovali inhibíciu arylamidázových enzýmov kryšieho mozgu iónami Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} a kyselinou etyléndiamíntetraoctovou. Podobné údaje o účinku tejto kyseliny uvádzajú Ellis a Perry (1966) pre enzýmy v extraktach hovädzej hypofýzy.

Na základe uvedených výsledkov môžeme usudzovať, že arylamidázové enzýmy sú metaloproteidy, ktorých enzymatická činnosť prebieha v okolí neutrálnej reakcie. Ich hojný výskyt v rôznych orgánoch napovedá významnosť funkcie týchto enzýmov v metabolizme látok peptidickej a bielkovinnej povahy, avšak ich presná metabolická úloha bude môcť byť v budúcnosti objasnená len po ďalšom hlbšom a intenzívnejšom štúdiu.

Literatúra

- BARTÍK M., BLAHOVEC J., 1971, Arylamidázová aktivita v pečeni a ľadvinách hovädzieho dobytky – rozdelenie aktivity v subcelulárnych frakciách. Vet. Med. (Praha) 2 : 91-98.
- BURSTONE M. S., FOLK J. E., 1956, Histochemical demonstration of aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. 4 : 217-226.
- ELLIS S., PERRY M., 1966, Pituitary arylamidases and peptidases. J. Biol. Chem. 241 : 3679-3686.
- FLEISHER G. A., PANKOW M., WARMKA C., 1964, Leucine aminopeptidase in human serum. Comparison of hydrolysis of L-leucylglycine and L-leucyl- β -naphthylamide. Clin. Chim. Acta. 9 : 259-268.
- GREEN M. N., TSOU K. C., BRESSLER R., SELIGMAN A. M., 1955, The colorimetric determination of leucine aminopeptidase activity with L-leucyl- β -naphthylamide hydrochlorid. Arch. Biochem. Biophys. 57 : 458.
- HOPUS V. K., MÄKINEN K. K., GLENNER G. G., 1966, Characterization of aminopeptidase B: Substrate specificity and effector studies. Arch. Biochem. Biophys. 114 : 567-575.
- MÄKINEN K. K., HOPUS V. K., 1967a, The active centre of aminopeptidase B. II. Kinetic studies. Enzymologia 32 : 347-363.
- MÄKINEN K. K., HOPUS V. K., 1967b, The presence of enzymes resembling aminopeptidase B in several rat organs. Ann. Med. exp. Fenn. 45 : 230-234.
- MARKS N., DATTA R. K., LAJTHA A., 1967, The relationship of aminotripeptidase and arylamidase to protein breakdown in the brain. Macromolecules and the function of the neuron. Praha.
- MARKS N., DATTA R. K., LAJTHA A., 1968, Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases. J. Biol. Chem. 243 : 2882-2889.
- NAGATSU I., NAGATSU T., GLENNER G. G., 1968, Species differences of serum amino acid β -naphthylamidases. Enzymologia 34 : 73-76.
- NACHLAS M. M., GOLDSTEIN T. P., SELIGMAN A. M., 1962, An evaluation of aminopeptidase specificity with seven chromogenic substrates. Arch. Biochem. Biophys. 97 : 223-231.
- REHFELD N., PETERS J. E., GIESECKE H., BEIER L., HASCHEN R. J., 1967, Untersuchungen über Aminosäure-arylamidasen. I. Verteilung und Isoenzyme der Aminosäure-arylamidase im menschlichen Organismus. Acta. biol. med. german. 19 : 809-818.
- SMITH E. L., SPACKMAN D. H., 1955, Leucine aminopeptidase V. Activation specificity, and mechanism of action. J. Biol. Chem. 212 : 271-299.

Došlo dne 21. 8. 1970

БЛАГОВЕЦ Й., БЛАГОВЦОВА К., БАРТИК М. (Ветеринарный институт, кафедра химии, биохимии и токсикологии, Кошице, Чехословакия). Ариламидазная активность в некоторых органах цыплят. *Vet. Med. (Praha)* 16 (5) : 319-327, 1971.

Мы определяли активность ариламидазных ферментов в сердце, печени, почках селезенке, мозге, мышцах, панкреасе и в сыворотке крови цыплят. Активность ферментов устанавливалась по хромогенным синтетическим субстратам л-лейцин-п-нитроанилида, л-лизин-п-нитроанилида и глицин-п-нитроанилида. Мы установили, что преобладающая часть активности локализуется во всех органах в их растворимых белковых фракциях (супернатанты свыше 106.000 г) за исключением тех ферментов, которые расщепляют л-лейцин-п-нитроанилид, в супернатантах печени и почек, где (особенно у почек) активность связана с нерастворимыми клеточными структурами. Ферменты отдельных органов чувствительны к основному субстрату л-лизин-п-нитроанилида, причем гидролиз глицин-п-нитроанилида протекал явно медленнее. Оптимальное pH действие ариламидазных ферментов в фосфатных буферах для всех трех субстратов имеет величину 7,5, причем рост активности наблюдался при концентрации 0,2 М в области pH оптимума. Оптимальное pH действие ферментов, инкубированных в Tris/HCl буферах, находится для субстрата л-лизин-п-нитроанилида в области pH 7,0, а для л-лейцин-п-нитроанилида и глицин-п-нитроанилида оно смещено по направлению к более щелочным величинам (pH 8,0). Присутствие двувалентных катионов Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} при концентрации $10^{-3}M$ вызвало понижение энзиматической активности, отчетливой, прежде всего, в случае Zn^{2+} и Cd^{2+} . Подобным образом действовала на активность ферментов и этилендиаминтетрауксусная кислота.

ариламидазные ферменты; активность органов; цыплят

BLAHOVEC J., BLAHOVCOVÁ K., BARTÍK M. (University of Veterinary Medicine, Dept. of Chemistry, Biochemistry and Toxicology, Košice, Czechoslovakia). *Arylamidase Activity in Some Organs of Chickens*. *Vet. Med. (Praha)* 16 (5) : 319-327, 1971.

We ascertained the activity of arylamidase enzymes in the heart, liver, spleen, kidney, brain, muscle, pancreas and blood serum of chickens. The enzyme activity was determined to the chromogenic synthetic substrates, L-leucyl-p-nitroanilid, L-lysyl-p-nitroanilid and glycyl-p-nitroanilid. We ascertained that the greater part of the activity was localized in all organs in soluble albuminous fractions (supernatants over 106.000 g) with the exception of enzymes splitting the L-leucyl-p-nitroanilid, in supernatants of the liver and kidney, where especially in the case of the kidney the activity was bound to insoluble cellular structures. The enzymes in each organ are more sensitive to the basic substrate L-lysyl-p-nitroanilid, the glycyl-p-nitroanilid hydrolysis being evidently the slowest. The optimum pH of the arylamidase enzymes in phosphate buffers has the value of 7,5 for all three substrates, an increase of the activity for the concentration 0,2 M in the area of the pH optimum being observed. For the substrate of L-lysyl-p-nitroanilid the optimum pH of the enzymes incubated in Tris/HCl buffers is in the area of pH 7,0, and for the L-leucyl-p-nitroanilid and glycyl-p-nitroanilid it is shifted on to more alcalic values (pH 8,0). The presence of bivalent cations Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} of a concentration of $10^{-3}M$ caused a decrease of the enzyme activity which was significant especially in the case of Zn^{2+} and Cd^{2+} . The ethylen-diamin-tetraacetic acid had a similar effect on the enzyme activity.

arylamidase enzymes; activity of organs; chicken

BLAHOVEC J., BLAHOVCOVÁ K., BARTÍK M. (Hochschule für Veterinärmedizin, Lehrstuhl für Chemie, Biochemie und Toxikologie, Košice, Tschechoslowakei). *Arylamidasenaktivität in einigen Organen der Kücken*. *Vet. Med. (Praha)* 16 (5) : 319-327, 1971.

Wir haben die Arylamidasenaktivitäten im Herz, in der Leber, Milz, in den Nieren, im Gehirn, im Muskel, im Pankreas und im Blutserum der Kücken ermittelt. Die Enzymaktivität haben wir zu den chromogenen synthetischen Substraten, L-leucin-p-Nitroanilid, L-Lysin-p-Nitroanilid und Glyzin-p-Nitroanilid bestimmt. Wir haben ermittelt, daß der größte Teil der Aktivität in allen Organen in den löslichen Eiweißfraktionen (Supernatante über 106.000 g) lokalisiert ist, mit der Ausnahme der das L-Leucin-p-Nitroanilid spaltenden Enzyme in Supernatanten der Leber und der Nieren, wo besonders im Falle der Niere die Aktivität auf unlösliche Zellstruk-

turen gebunden ist. Enzyme in den einzelnen Organen sind sensitiver auf das basische Substrat L-Lysin-p-Nitroanilid, wobei die Glyzin-p-Nitroanilid-Hydrolyse offenbar die langsamste war. Die optimale pH der Arylamidasenenzymwirkung in Phosphatpuffern für alle drei Substrate hat der Wert von 7,5, wobei ein Ansteigen der Aktivität für die Konzentration von 0,2 M in Bereich des pH-Optimums gemerkt wurde. Die optimale pH der Wirkung von, in Tris/HCl Puffern inkubierten Enzymen für das Substrat L-Lysin-p-Nitroanilid im Bereich der pH 7,0 liegt, und für L-Luzin-p-Nitroanilid und Glyzin-p-Nitroanilid ist zu mehr alkalischen Werten (pH 8,0) verschoben. Die Anwesenheit von Kationen Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} von einer Konzentration von 10^{-3} hatte eine Herabsinkung der enzymatischen Aktivität, die besonders im Falle von Zn^{2+} und Cd^{2+} ausgeprägt war, zur Folge. Eine ähnliche Wirkung auf die Enzymaktivität hatte die Ethylendiamintetraessigsäure.

Arylamidasen-Enzymen; Aktivität der Organe; Kücken

Adresa autorů:

Ing. J. Blahovec, ing. K. Blahovcová, prof. MVDr. M. Bartík, DrSc.,
VŠV, katedra chemie, biochemie a toxikologie, Košice

Výběr z nových přírůstků

Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTI na úseku veterinářství

D 57.558
Control of livestock insect pests by the sterile-male technique. Proceedings of the panel, Vienna, 23.-27. January 1967 organized by the Joint FAO/IAEA division of atomic energy in food and agriculture. Vienna, IAEA 1968. 102 s. obr. tab. (Hmyz cizopasný — hospodářská zvířata — hubení — metody — sterilizace samců — sborníky mezinárodní)

Leonard E. P. D 57.665
Praktikum der Kleintier-Chirurgie. Übersetzt aus Englisch. Berlin, P. Parey 1969. 183 s. 188 obr. (Veterinärn chirurgie — zvířata malá — příručky)

Borowski R. E 32.497/232
Erfahrungen mit der Hauttransplantation nach BRAUN bei Zitzenverletzungen der Milchkühe. Inaug.-Diss. der Tierärztliche Hochschule Hannover. Hannover, Klinik f. Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes der Tierärztl. Hochschule 1969. 64 s. tab. (Transplantace kožní — struky — poranění — metody — Braunova — výzkum)

Frank E. E 33.351/98
Ovarialsystem der Rinder als Abgangsursache in Südwürttemberg - Hohenzollern im Jahre 1965. Inaug.-Diss. der Veterinärmedizin. Fag d. J. Liebig-Univ. zu Giessen. Giessen, Inst. f. Erbpäthologie 1968. 59 s. mp. tab. (Vaječníky — cysty — krávy — výzkum)

Schröder K. E 32.497/264
Untersuchungen über Aetiologie, Blutserumwerte und Behandlungsmöglichkeiten der Gebärpause beim Rind. Inaug.-Diss. d. Tierärztl. Hochschule Hannover. Hannover, Klinik f. Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes der Tierärztl. Hochschule 1969. 42. s. 7 obr. 20 tab. (Obrna poporodní — krávy — etiologie a léčení — výzkum)

Dahms L. E 32.497/237
Untersuchungen zur Gebärpause bei einigen deutschen Rinderrassen. Inaug.-Diss. d. Tierärztl. Hochschule Hannover. Hannover, Inst. f. Tierzucht u. Vererbungsforschung d. Tierärztl. Hochschule 1969. 85 s. tab. (Obrna poporodní — dojnice — vlivy — výzkum)

Mykobakterien und mykobakterielle Krankheiten. Teil 7. Bovine Tuberkulose, aviäre Tuberkulose und andere Mykobakteriosen. Jena, VEB G. Fischer 1970. 415 s., bar. obr., tab. (Mykobakteriomy — příručky)

Siccardi F. J., Burtmester B. R.

C 2.485/1412
The differential diagnosis of lymphoid leukosis and Marek's disease. Technical bulletin No. 1412. Washington, U. S. depart. of agric 1970. 24. s. 21 obr. 1 příl. (Kuřata — nemoci — leukosa lymfoidní — diagnosa — metody — výzkum / Kuřata — nemoci virové — Markova obrna — diagnosa — metody — výzkum)

Terpstra C. D 51.973/51
Nairobi sheep disease. Studies on virus properties, epizootiology and vaccination in Uganda. Proefschrift aan de Rijksuniversiteit Utrecht. (Sourhrn hol., fran.) Utrecht, n. vl. (1970). 172 s. 9 obr. 35 tab. (Nemoc Nairobi — ovce — výzkum)

K. Koudela, Z. Sova, F. Baloun, Z. Němec

Vysoká škola zemědělská, Praha

KOUDELA K., SOVA Z., BALOUN F., NĚMEC Z. *Denní rytmus sérových bílkovin kohoutků LB*. Vet. Med. (Praha) 16 (5): 329-334, 1971.

U třiceti dvanáctidenních kohoutků plemene LB jsme studovali denní rytmus celkových bílkovin a jejich frakcí v séru krevním. Celkové bílkoviny byly stanoveny biuretovou metodou, frakce sérových bílkovin elektroforézou na papírovém nosiči. V průběhu dne se v šestihodinových intervalech neprokázaly signifikantní výkyvy v celkové proteinémii i v relativním zastoupení albuminů a beta- i gama-globulinů. Zjistili se signifikantní výkyvy v relativním zastoupení alfa-globulinů.

časná postinkubační ontogeneza; kur domácí; celkové bílkoviny; elektroforéza; denní rytmus

Fyziologické procesy mají u lidí i u zvířat nápadné rytmické výkyvy v průběhu dne, tzv. denní neboli cirkadenní rytmus (Bünning 1964, Aschoff, Meyer, Lohmann 1954, Milis 1966, Winget a kol. 1968, Halberg 1969).

Důležitý význam v regulačních mechanismech denních rytmů má světlo (= tzv. dominantní synchronizátor — Halberg a kol. 1960), výživný stav, periodicitu příjmu potravin, funkční stav žláz s vnitřní sekrecí (Baril a Potter 1968) a denní kolísání dalších metabolitů — glukózy, elektrolytů, N metabolitů (Bahorsky a Bernardis 1967, Calgutt 1967) či plazmatických aminokyselin (Feigin a kol. 1968).

Na denní rytmus celkových bílkovin, nukleových kyselin a volných aminokyselin v játrech kura domácího upozornil Squibb (1964), a to i s ohledem na zvláštnosti světelného režimu (Squibb 1968). Tento autor také poprvé zjistil denní rytmus celkových bílkovin, volných aminokyselin, nukleových kyselin (DNK a RNK) v séru, játrech a v prsních svalech kuřat (Squibb 1966).

V séru kulminovala hladina celkových bílkovin během tří denního sledování třikrát v 15.00 hod., dílčí maximum pak po dva dny ve 24.00 hod., jednou prokázal dílčí vzestup ve 20.00 hod. Po dva dny byly minimální hodnoty celkových bílkovin prokázány v 08.00 hod., třetí den dosáhla hladina celkových bílkovin minima ve 24.00 hod. Cirkadenní oscilace mezi minimem a maximem byly signifikantní ($p < 0,05$).

MATERIÁL A METODY

Kuřata se odchovávala v bateriových klecích v pokusné stáji katedry při dodržení běžných zootechnických podmínek. První týden po vylíhnutí se udržovala teplota 30 °C, v dalších týdnech jsme ji postupně snižovali a ke konci pokusu se pohybovala okolo 20 °C. Relativní vlhkost kolísala kolem 70 %. Kuřata byla krmena *ad libitum* kompletní směsí pro kuřata „K“. Po celý den měla kuřata přístup k pitné vodě. Krev se získávala v šestihodinových intervalech, a to od kuřat 12 dní starých.

Kuřata byla utracena dekapitací, krev se odchyťovala do centrifugačních zkumavek. Konečné oddělení séra od krevního koláče se provedlo centrifugací (3000 ot/min., 15 minut). K vyšetření bylo použito pouze sérum nehemolyzované. Vzorky séra jsme do doby zpracování ukládali do chladničky.

Celkové bílkoviny jsme stanovili biuretovou metodou. Frakce sérových bílkovin byly stanoveny na papíře Whatman I, dělicí doba šest hodin, napětí 280 V, intenzita 8–15 min. Vzorky séra byly zpracovány po 24hodinové úschově v chladničce, při elektroforéze byl použit veronaloxalát-citrátový pufr o pH 8,5 a iontové síle 0,06. Frakce byly barveny roztokem bromfenolové modři (Hořejší a kol. 1964).

Celkem bylo vyšetřeno 30 kohoutků na celkové bílkoviny a 30 kohoutků na frakce sérových bílkovin.

VÝSLEDKY

CELKOVÉ BÍLKOVINY

V průběhu dne celková proteinémie u kohoutků 12 dní starých kolísala málo výrazně (tab. I, obr. 1).

Analýzou rozptylu při dvojnásobném třídění ($p < 0,05$) se nezjistily signifikantní rozdíly.

FRAKCE SÉROVÝCH BÍLKOVIN

Výsledky sledování podílů frakcí sérových bílkovin v průběhu dne shrnuje tabulka II.

Výkyvy relativního zastoupení jednotlivých frakcí byly minimální (obr. 2).

Analýzou rozptylu při dvojnásobném třídění ($p < 0,05$) se zjistily signifikantní rozdíly pouze v zastoupení alfa globulinů mezi odběrem v 08.30 a 02.30 h.

I. Denní rytmus celkových bílkovin v séru kohoutků LB ve stáří 12 dní (v g/100 ml séra)

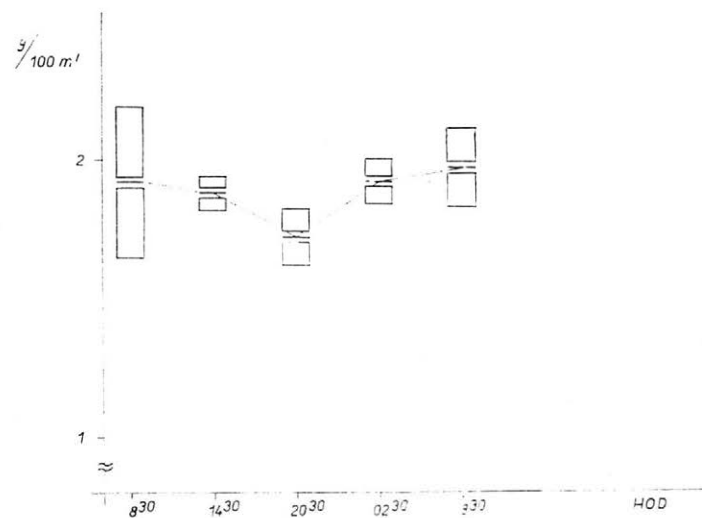
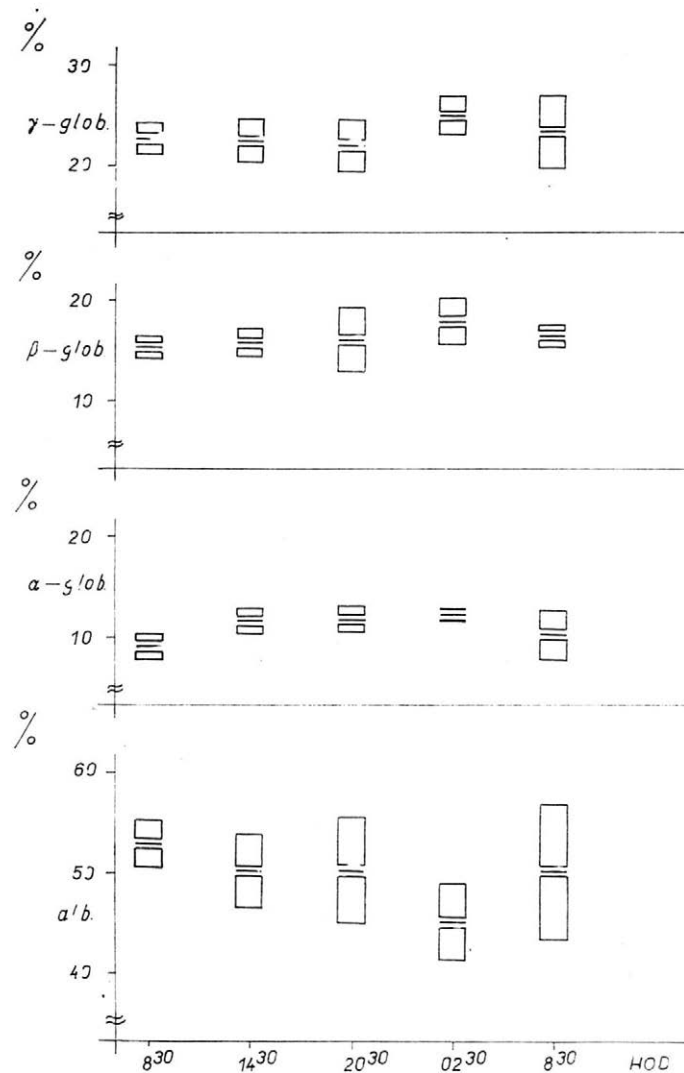
Hod.	n	$\bar{x}$	s	v	I	
					1	2
08.30	6	1,92	0,27	14,25	2,21	1,63
14.30	6	1,88	0,06	3,30	1,94	1,81
20.30	6	1,72	0,10	5,69	1,82	1,62
2.30	6	1,92	0,08	3,95	2,00	1,84
08.30	6	1,97	0,14	6,98	2,12	1,83

II. Denní rytmus frakcí sérových bílkovin u kohoutků LB ve stáří 12 dní
(v relativních procentech)

Hod.	n	$\bar{x}$	s	v	I	
					1	2
albuminy						
08.30	6	52,90	2,30	4,35	55,31	50,49
14.30	6	50,15	3,63	7,23	53,96	46,34
20.30	6	50,23	5,22	10,40	55,72	44,75
02.30	6	45,08	3,76	8,35	49,03	41,13
08.30	6	50,10	6,76	13,49	57,19	43,01
globuliny — alfa						
08.30	6	9,13	1,13	12,36	10,32	7,95
14.30	6	11,62	1,24	10,67	12,92	10,32
20.30	6	11,78	1,30	11,04	13,15	10,42
02.30	6	12,22	0,63	5,16	12,88	11,55
08.30	6	10,20	2,47	24,19	12,79	7,61
globuliny — beta						
08.30	6	15,32	1,09	7,09	16,46	14,18
14.30	6	15,75	1,38	8,77	17,20	14,30
20.30	6	16,00	3,20	20,02	19,36	12,64
02.30	6	17,75	2,31	12,99	20,17	15,33
08.30	6	16,43	1,14	16,91	17,63	15,24
globuliny — gamma						
08.30	6	22,65	1,56	6,87	24,28	21,02
14.30	6	22,48	2,14	9,52	24,73	20,24
20.30	6	21,98	2,55	11 58	24,66	19,31
02.30	6	24,95	1,89	7,58	26,94	22,96
08.30	6	23,27	3,61	15,52	27,06	19,48

DISKUSE

Současně se studiem denního rytmu jsme sledovali rytmicity dalších tkáňových i plazmatických metabolitů. Na rozdíl od Squibba (1966) jsme výrazné kolísání celkové proteinémie neprokázali. Je nutno zdůraznit, že v našem pokuse jsme použili mladší kohoutky než použil Squibb (1968). Lze předpokládat, že denní rytmicity sérových bílkovin se mohla u čtyřtýdenních kuřat vyvinout a zafixovat podstatně lépe než u našich kohoutků, které jsme utratili již ve stáří 12 dní. Volba tohoto časového období v našem pokuse nebyla náhodná. V řadě analýz fyziologických funkcí kura domácího ve druhém týdnu postinkubačního života se nám podařilo zjistit tendence ke stabilizaci, což bude pravděpodobně spojeno s nutričními adaptacemi ve fázi skončení výživy ze žloutkového váčku.



1. Denní rytmus celkových bílkovin v séru kohoutků LB ve stáří 12 dní

2. Denní rytmus sérových bílkovin kohoutků LB ve stáří 12 dní

Literatura

- ASCHOFF J., MEYER-LOHMANN J., 1954, Angeborene 24-Stunden-Periodik beim Kücken. *Pflügers Arch. physiol. Chem.* 260, 2:170-176.
- BAHORSKY M. S., BERNARDIS L. L., 1967, Circadian rhythmicity of some key metabolites in the fasted and fed weanling female rat. *Experientia* 23, 5: 634-637.
- BARIL G. E., POTTER L. C., 1968, Physiological investigations on hormonal regulation in chickens. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* 59, 4: 1131-1134.
- BÜNNING E., 1964, *The physiological clock*. Springer Verlag, Heidelberg - Berlin.
- CALCUTT G., 1967, Diurnal variations in rat blood glutathion levels. *Naturwiss.* 5, 1: 54-56.
- FEIGIN A. E., ROGERS Q. R., NYBERG H. G., 1968, Aminoacid transport and regulation by food intake. *Adv. Protein Chem.* 18: 142-151.
- HALBERG F. a kol., 1960, cit. HALBERG F., 1969.
- HALBERG F., 1969, Chronobiology. *Ann. Rev. Physiol.* 31: 675-725.
- HOREJŠÍ J. a kol., 1964, *Základy chemického vyšetřování v lékařství*. Praha, SZdN.
- MILLS J. M., 1966, Human circadian rhythms. *Physiol. Rev.* 46: 126-179.
- SQUIBB L. R., 1964, Diurnal rhythms in blood and tissue components in the chicks. *J. Nutr.* 87, 5: 489-493.
- SQUIBB L. R., 1966, Diurnal rhythms of tissue components related to protein metabolism in normal and virus-infected chicks. *J. Nutr.* 90, 1: 71-75.
- SQUIBB L. R., 1968, Interrelationship of lighting regimen and virus infection to diurnal rhythms in liver components associated with protein metabolism in the chick. *J. Nutr.* 95, 3: 357-362.
- WINGET C. M., CARD D. H., POPE J. M., 1968, Circadian oscillations of three parameters at defined light intensities and color. *J. appl. Physiol.* 24, 3: 401-406.

Došlo dne 8. 7. 1970

КОУДЕЛА К., СОВА З., БАЛОУН Ф., НЕМЕЦ З. (Сельскохозяйственный институт, кафедра физиологии сельскохозяйственных животных, Прага, Чехословакия). *Суточный ритм серозных белков у петушков леггорн белый*. *Vet. Med. (Praha)* 16 (5): 328-334, 1971.

У 30 двенадцатидневных петушков породы леггорн белый изучался суточный ритм общих белков и их фракций в сыворотке крови. Общие белки определялись биуретовым методом, фракция серозных белков — электрофорезом на бумажном носителе. В течение дня в 6-часовых интервалах достоверно не было установлено отклонений в общей протеинемии и в относительном замещении альбуминов β - и γ -глобулинов. Были установлены достоверные отклонения в относительном замещении альфа-глобулинов.

ранний послеинкубационный онтогенез; домашние куры; общие белки; электрофорез; суточный ритм

KOUDELA K., SOVA Z., BALOUN F., NĚMEC Z. (University of Agriculture, Chair of Animal Physiology, Praha, Czechoslovakia). *Daily Cycle of Serum Albumins in WL Cocks*. *Vet. Med. (Praha)* 16 (5): 329-334, 1971.

30 twelve days old cocks were investigated with view to study the daily cycle of total proteins and their fractions in the blood serum. For the determination of the total protein values there was used the biuret method and for the fractions of the serum albumins there was applied the electrophoresis technique on paper. Observations made in intervals of six hours during the day did not reveal any significant deviations in the values of the total proteinemia, the relative proportion of albumin values nor in the β and γ globuline levels. However, significant differences were found in the relative proportion of the alpha globulin values.

early ontogenesis after incubation; domestic fowl; total proteins; electrophoresis; daily cycle

KOUDELA K., SOVA Z., BALOUN F., NĚMEC Z. (Hochschule für Landwirtschaft, Lehrstuhl für Physiologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Praha, Tschechoslowakei). *Tagesrhythmus der Serumeiweißstoffe bei Weißen Leghornhähnchen*. *Vet. Med. (Praha)* 16 (5): 329-334, 1971.

Bei 30 zwölfstündigen Weißen Leghornhähnchen wurde der Tagesrhythmus des Gesamteiweißes und dessen Fraktionen im Blutserum untersucht. Das Gesamteiweiß wurde mit Hilfe der Biuretprobe und die Fraktionen des Serumeiweißes wurden mit Hilfe der Elektrophorese auf Papierträger bestimmt. Im Verlaufe des Tages wurden in sechsstündigen Intervallen keine signifikanten Schwankungen der Gesamtproteinämie und der relativen Vertretung der Albumine und β - und γ -Globuline nachgewiesen. Signifikante Unterschiede dagegen wurden in der relativen Vertretung der Alpha-Globuline festgestellt.

Frühe Postinkubationsontogenese; Haushuhn; Gesamteiweiß; Elektrophorese; Tagesrhythmus

Adresa autorů:

Doc. MVDr. K. Koudela, CSc., prof. MVDr. Z. Sova, DrSc., ing. F. Baloun, ing. C. Z. Němec, VŠZ, katedra fyziologie hospodářských zvířat, Praha - Suchbátarův

VLIV TECHNOLOGICKÉ ÚPRAVY ZRNA BOBU KOŇSKÉHO NA HLADINU KREVNÍ GLUKÓZY U KOHOUTKŮ

L. Slesinger

Výzkumný ústav výživy zvířat, Pohořelice

ŠLESINGER L. *Vliv technologické úpravy zrna bobu koňského na hladinu krevní glukózy u kohoutků.* Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 335-339, 1971.

V práci byla sledována hladina krevní glukózy toluidinovou metodou u 150 kuřat, živěných do stáří devíti týdnů technologicky upraveným a surovým bobem ve 33% úhradě za živočišnou bílkovinu. Vliv zrna bobu koňského, kterým byla živočišná bílkovina směsi K uhrazena ve výši 33%, se uplatnil na hladinu krevní glukózy u obou pokusných skupin kohoutků oproti kontrole vysoce průkazně depresivně ($P < 0,001$). Průkazně nižší hladina krevní glukózy u pokusné skupiny kohoutků živěných toastovaným bobem ve 33% úhradě za živočišnou bílkovinu v porovnání s vyšší hladinou krevní glukózy u pokusné skupiny kohoutků živěných 33% úhradou surového bobu se zdůvodňuje přítomností glykosidů kyanidů v zrnu bobu a jeho vlivem na slinivku břišní. Nemalý význam se rovněž příkládá denaturaci bílkovin a hydrolyze lyzinu při toastování bobu.

krevní glukóza; toastování; bob koňský; kyanoglykosidy; stravitelnost bílkovin

Glukóza je látka nejsnadněji přístupná tvorbě energie u živých organismů. Na základě hormonální regulace ukládá nebo odevzdává jaterní parenchym glukózu do krve, ostatní orgány kryjí svoji potřebu přijímáním krevní glukózy. Jaterní parenchym společně s adrenergickými orgány udržují v krvi drůbeže vysokou hladinu glukózy. Na základě našeho pozorování se hladina glukózy v krvi pohybovala u kuřat 10 týdnů starých kolem 200 mg%. Zdůvodnění lze hledat v následujících poznatech. Pravděpodobnou zásadní příčinou vysoké hladiny krevní glukózy jsou odlišné hormonální poměry u drůbeže. V podstatě je to vysoká hladina adrenalinu v nadledvinách a podle V u y l s t e k e h o a D e D u v e h o (1953) rovněž vysoká potence glukagonu u drůbeže. Oba hormony udržují vysokou hladinu glukózy v krvi, neboť podmiňují glykogenolýzu v játrech a adrenalin také ve svalovině. Mezi další poznatky odlišného biochemismu drůbeže patří mohutná schopnost jater odbourávat insulin (H a z e l w o o d 1958). Z uvedeného vyplývá neobvykle vysoká tolerance insulinu u kuřat (Š t u m p f 1968), což brání vyvolání hypoglykemického šoku u drůbeže daleko vyššími dávkami insulinu než je tomu např. u krys. Teprve až po hepatektomii jsou kuřata citlivá k hypoglykemickému šoku (H a z e l w o o d 1958).

Na základě našeho dřívějšího pozorování jsme se přesvědčili, že hladinu krevní glukózy lze ovlivnit složením krmné dávky (Š l e s i n g e r 1970). V předložené práci jsme proto sledovali vliv technologicky upraveného a neupraveného zrna bobu na hladinu krevní glukózy u kuřat. Zrno bobu bylo zvoleno proto, že má dobrou perspektivu při úhradě za živočišnou bílkovinu v krmivu pro drů-

bež a také pro přítomnost glykosidických vazeb kyanidů (Šlesinger 1970). Kvalitní bílkoviny hrají rovněž důležitou úlohu v otázce glykoneogeneze u drůbeže.

Účel technologické úpravy zrna bobu spatřujeme jednak v destrukci glykosidických vazeb v bílkovině bobu a v denaturaci rostlinných bílkovin vyšší teplotou, což by se mělo projevit nejen v jejich využitelnosti, ale také v metabolismu celkových živin.

METODIKA

Hladina glukózy byla sledována na 150 kohoutcích leghornka bílá, z nichž 50 bylo kontrolních, živěných směsí K, 50 pokusných, živěných směsí K, v níž 33 % živočišné bílkoviny bylo uhrazeno zrnem bobu surového, odrůdy Přerovské, a dalším 50 kohoutkům byla směs K uhrazena 33 % bobu toastovaného. Hladiny aminokyselin, minerálií a vitamínů byly ve směších pokusných kuřat předem vyrovnány na hladiny kontrolní skupiny.

Pokus probíhal od stáří 1 týdne, do konce 9. týdne, kdy se ukončil. Toastováním rozumíme zahřátí zrna bobu v autoklávu při 100 °C po dobu 1 hodiny, v prostředí o pH 5,5 a vysušení při 60 °C (pH bylo upravováno pomocí HCl). Kuřata byla chována v klecích po deseti kusech. Krev byla odebrána v 9. týdnu stáří kuřat z *vena tarsometatarsica*. Glukóza byla určována okamžitě metodou ortotoluidinovou z celé krve. Hladiny glukózy byly měřeny na Pulfrichově fotometru při 610 nm a jsou udány v mg%. Výsledky byly vyhodnoceny statisticky pomocí t-testu podle Studenta.

Krmná dávka použitá u pokusných skupin byla vyrovnána co do hladin aminokyselin (cystin, leucin, valin, treonin, arginin, fenylalanin), vitamínů (A a D) a minerálních látek (P a Zn) na základě vlastních analýz krmné směsi. Vitamíny byly doplněny v čisté formě podle tabulkových hodnot. Aminokyseliny byly stanoveny po kyselé hydrolýze vzorků na automatickém analyzátoru aminokyselin typ Hd-1200E. Aminokyseliny byly doplňovány v čisté formě. Fosfor byl stanoven metodou molybdao-vanadovou podle Stuffleins (1957). Zinek byl stanoven atomovou absorpcí podle Heckmana (1967).

VÝSLEDKY

Hodnoty glukózy v krvi u 9 týdnů starých kontrolních a pokusných kohoutků jsou shrnuty v tab. I.

Hladina glukózy v krvi u kontrolních kohoutků živěných směsí K se pohybovala v průměru $205 \pm 14,6$ mg%. V krvi kuřat obou pokusných skupin, u nichž byla živočišná bílkovina uhrazena 33 % surového a 33 % toastovaného bobu, byly hladiny glukózy vysoce průkazně nižší u obou skupin, porovnáme-li je s hladinami u kontrolní skupiny kohoutků ($P < 0,001$). Průměrná hladina krevní glukózy u skupiny kuřat živěných surovým bobem ve 33 % úhradě za živočišnou bílkovinu byla průkazně vyšší ve srovnání s pokusnou skupinou kuřat, které byla živočišná bílkovina uhrazena ve stejném procentu toastovaným bobem ($P < 0,01$) — tab. I. Také váhové přírůstky obou pokusných skupin při porovnání statistických hodnot s kontrolní skupinou kohoutků byly stanoveny rozdílností s výraznou statistickou významností vyšší než 0,1 %.

Výsledky nemůžeme hodnotit z hlediska literárních údajů, neboť jsme ob-

I. Hladiny glukózy v krvi u kuřat živěných surovým a toastovaným zrnem bobu koňského

N	Skupina	Hladina glukózy v mg %	Průměrná váha v kg
50	kontrolní K	205,0 ± 14,60	2,285 ± 56,9
50	bob surový 33 % P ₁	158,2 ± 10,80	2,105 ± 71,8
50	bob toastovaný 33 % P ₂	142,2 ± 12,99	2,098 ± 39,1
Rozdíly hodnot: K : P ₁ K : P ₂ P ₁ : P ₂		46,8*** 62,8*** 16,0**	0,181** 0,188** 0,007

dobné práce konané na kuřatech v dostupné literatuře nenalezli. Rozvedeme proto v následující diskusi jednak naše výsledky, jednak působnost kyanidů, popřípadě jejich oxidačních zplodin na organismus.

DISKUSE

Nižší hladiny krevní glukózy u pokusných skupin kuřat s úhradou 33 % živočišné bílkoviny surovým a toastovaným zrnem bobu lze vysvětlit nižší biologickou hodnotou bílkovin zrna bobu v porovnání s biologickou hodnotou živočišné bílkoviny. Tuto dedukci lze také opřít o nižší váhové přírůstky obou pokusných skupin oproti skupině kontrolní ($P < 0,01$). Závažné jsou rozdílné hladiny glukózy obou pokusných skupin kuřat. Průkazně vyšší hladiny glukózy u pokusných kuřat s 33% úhradou surového bobu za živočišnou bílkovinu proti hladině glukózy kuřat živěných stejnou úhradou toastovaného bobu je možné zdůvodnit přítomností kyanovodíkových vazeb v zrně surového bobu (Šlesinger 1970), což se pokusíme vysvětlit níže.

Chronické otravy kyanidy nebyly u zvířat pozorovány, neboť kyanidy se v organismu nekumulují (Van der Walt a Onderstepoort 1944, Worden 1940), nýbrž se oxidační cestou mění ve rhodanidy. Ty se z těla velmi pozvolně vylučují a vykazují v orgánech vysoké hodnoty (Pulss 1967). Podle Boxera a Rickardse (1951) jsou rhodanidy v organismu vázány na bílkoviny. V organismu nepůsobí toxicky, mají však druhotné účinky na jeho fyziologické a biochemické funkce. Tak znemožňují např. příjem a vazbu jodidů ve štítné žláze a působí tudíž jako thyreostatika (Care 1954). To má dále za následek celou řadu biochemických poruch v organismu. Jednou z nich je negativní působení rhodanidů na funkci pankreasu, které spočívá v tom, že blokují tvorbu a vylučování insulinu, v důsledku čehož se pravděpodobně prokazují vyšší hladiny krevního cukru u zvířat.

Glykosidické vazby kyanidů se v játrech přeměňují pomocí atomů síry v rhodanidy. K detoxikaci kyanidů využívá organismus především důležitých aminokyselin, např. metioninu a cysteinu, které obsahují síru. Takto se součas-

ně organismus ochuzuje o důležité aminokyseliny, což je pravděpodobně jednou z příčin nižší biologické hodnoty bílkovin zrna bobu, a tím i nižších váhových přírůstků (tab. I). Podstatná je rovněž hydrolýza lyzinu při toastování.

V dostupné literatuře se zmiňuje na základě laboratorních pokusů na kryších pouze Hintz a kol. (1967) o toxickém působení fazole na organismus krysy s odezvou snížené hladiny glukózy v krvi. U drůbeže obdobná otázka nebyla zatím sledována.

Literatura

- BOXER G. E., RICKARDS J. C., 1951, Chemical determination of Vit. B₁₂. The quantitative isolation and colorimetric determination of milimicrogramm quantities of cyanide. Arch. Biochemistry 30 : 372-381.
- CARE A. D., 1954, Der Einfluß der Glykoside im Organismus. N. Z. J. Sci. Technology. 36 A : 321-324.
- HAZELWOOD R. L., 1958, The peripheral action of tolbutamine in domestic fowl. Endocrinology 63 : 611-613.
- HECKMAN M., 1967, Minerals in Feeds by Atomic Absorption Spectrophotometry. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 50 : 107-111.
- HINTZ H. F., HOGUE D. E., KROOK L., 1967, Toxicity of Red Kidney Beans in the Rat. The J. of Nutrition 93 : 77-81.
- PULSS H., 1967, Blausäure Glykoside als alimentäre Wirkstoffe in der Nutztierhaltung. T. Umschau 8 : 412-414.
- STUFFINS C. B., 1967, The Determination of Phosphate and Calcium in Feeding Stuffs. Analyst 92 : 107-111.
- ŠLESINGER L., 1970, Vliv alkaloidů, glykosidů a antienzymů obsažených v tužemských luštěninách na stravitelnost a využitelnost krmiv a krmných dávek u prasat a drůbeže. Odstranění nepříznivých účinků vhodnou technologickou úpravou. Závěrečná zpráva VÚVZ Pohořelice.
- ŠTUMPF J., 1968, Vliv injekčně podávaného insulinu na obsah krevního cukru u kuřat. Celostátní konference o fyziologii drůbeže, VŠZ Praha.
- VAN DER WALT, OMDERSTEEP S. L., 1944, Toxicity of KCN in the Laboratory animals. J. Vet. Sci. 19 : 79-81.
- VUYLSTEKE C. H., DE DUVE, 1953, Le Contenu en glukagon du pancreas aviaire. Arch. Internat. Physiol. 61 : 273-276.
- WORDEN A. N., 1940, CN-glycosid Transformation and the results of Liver function. The Vet. Record 52 : 45-49.

Došlo dne 8. 7. 1970

ШЛЕЗИНГЕР Л. (Научно-исследовательский институт питания животных, Погорельниц-у-Брно, Чехословакия). Влияние технологической обработки зерна конских бобов на уровень глюкозы в крови петушков. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 335-339, 1971.

В ходе работы по толудиновому методу изучали уровень глюкозы в крови 150 цыплят, откармливаемых до 9-недельного возраста как технологически обработанными, так и сырыми бобами в 33%-ой компенсации животного белка. Бобовое зерно, которым была компенсирована животная белковая смесь в размере 33 %, оказало высокодепрессивное ($P < 0,001$) влияние на уровень глюкозы в крови обеих подопытных групп петушков по сравнению с контролем. Достоверно низший уровень кровяной глюкозы у кормленных обжаренным бобом петушков с 33%-ой заменой животного белка по сравнению с более высоким ее уровнем у петушков с 33%-ой заменой сырых бобов обосновано наличием глюкозидов кианидов в бобовом зерне и его отрицательным влиянием на поджелудочную железу. Немалое значение придается также денатурации белков и гидролизу лизина при обжаривании боба.

глюкоза крови; обжаривание; конский боб; кианоглюкозиды; переваримость белков

ŠLESINGER L. (Research Institute of Animal Nutrition, Pohořelice u Brna, Czechoslovakia). *The Effect of Technological Treatment of Horse-Bean Grain on the Blood-Glucose Level in Cockerels*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 335-339, 1971.

The study was undertaken for the examination of the blood-glucose level in 150 chickens fed technologically treated and raw bean as a 33 % substitute for animal protein up to the age of nine weeks. The method employed was toluidine testing. The effect of the grain of horse bean which was used as a substitute for 33 % of animal protein K was highly significantly depressive ($P < 0.001$) in the two experimental groups of cockerels in comparison with the controls. The significantly lower level of blood glucose in the experimental group of cockerels fed toasted bean as 33 % substitute for animal protein, in comparison with the higher level of blood glucose in the experimental group of cockerels fed a 33 % raw bean substitute, is ascribed to the presence of glycosides and cyanides in bean grain and to its negative effect on pancreas. High importance is attached also to denaturation of protein and hydrolysis of lysine in bean toasting.

blood glucose; toasting; horse bean; cyanoglycosides; digestibility of proteins

ŠLESINGER L. (Forschungsinstitut für tierische Ernährung, Pohořelice u Brna, Tschechoslowakei). *Einfluß der technologischen Aufbereitung des Pferdebohnenkorns auf den Blutglukosespiegel bei Junghähnen*. Vet. Med. (Praha) 16 (5) : 335-339, 1971.

In der Arbeit wurde mittels Toluidinmethode der Blutglukosespiegel bei 150, bis zum Alter von 9 Wochen der mit technologisch aufbereiteten und rohen Bohnen in 33 %-iger Deckung für tierischen Eiweißstoff genährten Küken verfolgt. Der Einfluß des Pferdebohnenkorns, mit dem der tierische Eiweißstoff der K-Mischung in einer Höhe von 33 % ersetzt wurde, auf den Glukosespiegel kam bei den beiden Versuchsgruppen der Junghähne hoch signifikant depressiv ($P < 0,001$) im Vergleich zu der Kontrolle zur Geltung. Der signifikant niedrigere Blutglukosespiegel bei der Versuchsgruppe der mit toasteter Bohne als 33 %-igen Ersatz für tierischen Eiweißstoff genährten Junghähne im Vergleich zum höheren Blutglukosespiegel bei der Versuchsgruppe der mit 33 %-igem Ersatz der Rohbohne genährten Junghähne wird mit der Anwesenheit der Kyanidglykoside im Bohnenkorn und ihres negativen Einflusses auf die Bauchspeicheldrüse erklärt. Eine nicht geringe Bedeutung wird auch der Eiweißstoffdenaturation und der Lysinhydrolyse bei der Bohnen-toastierung beigemessen.

Blutglukose; Toastierung; Pferdebohne; Kyanoglykosiden, Verdaulichkeit der Eiweißstoffe

Adresa autora:

MVDr. L. Šlesinger, CSc., Výzkumný ústav výživy zvířat, Pohořelice

Upozorňujeme čtenáře na obsah 6. čísla časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Bartoš J., Lebduška J., Poláková M.: Účinnost kombinací streptomycinu se sulfonamidy a furazolidonem při kolibacilózách novorozených telat

Lebeda M., Bouda J.: Účinek dlouhodobých acidogenních a alkalogenních zátěží na acidobazický stav skotu

Zapletal O., Hofírek B.: Vliv intoxikace amoniakem močoviny na některé vlastnosti bachorové tekutiny přežvýkavců

Konrád J., Nevoile M.: K výskytu Aleutské choroby (plazmocytozy) norků v ČSSR

Lukášová J.: Účinek některých dezinfekčních prostředků na kmeny *Staphylococcus aureus*

Munk Z., Vrba Z.: Plodnost anglických plnokrevných klisen

OBSAH

Komárek J., Dvořák J.: Příklad tumorózní lymfatické leukózy skotu s neobyčejně vysokým počtem leukocytů 281

Šrámek J.: Vliv vysokých dávek močoviny na zdravotní stav telat 285

Pokorný B., Starošík L.: Zkušenosti s makroaglutinační reakcí v sérologické diagnostice leptospiróz u hospodářských zvířat 295

Tomeš Z., Hrušovská V.: Záchyty salmonel imunofluorescencí ve srovnání s kultivačním vyšetřením 303

Starý Z.: Nový způsob čištění biologických extraktů při stanovení reziduí chlorovaných insekticidů 311

Blahovec J., Blahovcová K., Bartík M.: Arylamidázová aktivita v niektorých orgánoch kurčiat 319

Koudela K., Sova Z., Baloun F., Němec Z.: Denní rytmus sérových bílkovin kohoutků LB 329

Šlesinger L.: Vliv technologické úpravy zrna bobu konského na hladinu krevní glukózy u kohoutků 335

СОДЕРЖАНИЕ

Комарек И., Дворжак Й.: Случай опухолевого лимфатического лейкоза крупного рогатого скота с необычно большим количеством лейкоцитов 283

Шрамак Й.: Влияние высоких доз мочевины на состояние здоровья телят 293

Покорны Б., Старошик Л.: Опыт с макроагглютинирующей реакцией в серологической диагностике лептоспирозов у сельскохозяйственных животных 300

Томеш З., Грушовска В.: Улавливание салмонелл при помощи иммунофлуоресценции в сопоставлении с культивационным исследованием 303

Стары З.: Новый способ очистки биологических экстрактов при определении остаточных последствий хлорированных инсектицидов 317

Благовец Й., Благовцова К., Бартик М.: Ариламидазная активность в некоторых органах цыплят 326

Коудела К., Сова З., Балоун Ф., Немец З.: Суточный ритм серозных белков у петушков леггорн белый 333

Шлезингер Л.: Влияние технологической обработки зерна конских бобов на уровень глюкозы в крови петушков 338

CONTENT

Komárek J., Dvořák J.: A Case of Tumorous Bovine Lymphatic Leucosis with an Extraordinarily High Number of Leucocytes 283

Šrámek J.: Effect of High Urea Doses on the State of Health in Calves 294

Pokorný B., Starošík L.: Experience with Macro-Agglutination Reaction in the Serologic Diagnostics of Leptospiroses in Farm Animals 301

Tomeš Z., Hrušovská V.: Salmonella Capture based on Immunofluorescence, in Comparison with Cultivation Examination 308

Starý Z.: A New Method of the Purification of Biological Extracts in the Determination of the Residues of Chlorinated Insecticides 318

Blahovec J., Blahovcová K., Bartík M.: Arylamidase Activity in Some Organs of Chickens 326

Koudela K., Sova Z., Baloun F., Němec Z.: Daily Cycle of Serum Albumins in WL Cocks 333

Šlesinger L.: The Effect of Technological Treatment of Horse-Bean Grain on the Blood-Glucose Level in Cockerels 339

INHALT

Komárek J., Dvořák J.: Ein Fall der tumorösen lymphatischen Leukose des Rindes mit einer ungewöhnlich hohen Leukozytenanzahl 284

Šrámek J.: Einfluß hoher Harnstoffgaben auf den Gesundheitszustand der Kälber 294

Pokorný B., Starošík L.: Erfahrungen mit der Makroagglutinationsreaktion in der serologischen Diagnostik der Leptospirosen bei landwirtschaftlichen Nutztieren 301

Tomeš Z., Hrušovská V.: Salmonellenauffangen mittels Immunofluoreszenz im Vergleich zur Kultivierungsuntersuchung 308

Starý Z.: Neue Reinigungsart der biologischen Extrakte bei der Residuenbestimmung der chlorierten Insektiziden	318
Blahovec J., Blahovcová K., Bartík M.: Arylamidasenaktivität in einigen Organen der Kücken	326
Koudela K., Sova Z., Baloun F., Němec Z.: Tagesrhythmus der Serumweißstoffe bei Weißen Leghornhähnen	333
Šlesinger L.: Einfluß der technologischen Aufbereitung des Pferdebohnenkorns auf den Blutglukosespiegel bei Junghähnen	339

TABLE DES MATIÈRES

Komárek J. Dvořák J.: Cas de leucose lymphatique tumorale des bovins, accusant un nombre extraordinaire de leucocytes (res. An/283, Al/284).	
Šrámek J.: Influence des doses élevées d'urée sur l'état sanitaire des veaux (res. An, Al/294).	
Pokorný B., Starošík L.: Expériences faites avec la réaction de macroagglutination dans le diagnostic sérologique des leptospires chez les animaux de ferme (res. An, Al/301).	
Tomeš Z., Hrušovská V.: Constatation des salmonellas par immunofluorescence comparativement à l'exploration du milieu de culture (res. An, Al/308).	
Starý Z.: Mode nouveau de purification des extraits biologiques lors de la détermination des résidus des insecticides chlorés (res. An, Al/318).	
Blahovec J., Blahovcová K., Bartík M.: Activité de l'arylamidase dans certains organes des poulets (res. An, Al/326).	
Koudela K., Sova Z., Baloun F., Němec Z.: Rythme quotidien des matières albuminoïdes sériques des jeunes coqs de la race Leghorn blanche (res. An, Al/333).	
Šlesinger L.: Influence de l'adaptation technologique du grain de fève de cheval sur le niveau du glucose sanguin des coquelets (res. An, Al/339).	