

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

7

ROČNÍK 16 (XLIV)
PRAHA
ČERVENEC 1971
CENA 10 Kčs

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Rídí 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. Издает 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 Inform-
ation. 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.

MECHANISMUS REAKCE MASTITIS TESTU – NK A ZPŮSOB POSUZOVÁNÍ JEHO POZITIVITY

D. Ryšánek, V. Renda

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

RYŠÁNEK D., RENDA V. *Mechanismus reakce Mastitis testu-NK a způsob posuzování jeho positivity.* Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 405-414, 1971.

Na základě pozorování a laboratorního šetření bylo zjištěno, že čerstvě nadojené vzorky mléka, odebrané bezprostředně před dojením a okamžitě vyšetřené Mastitis testem-NK, vykazují jen gelifikační fázi reakce. Výskyt flokulační fáze je podmíněn skladováním vzorku a vázán na přítomnost mléčného tuku. Bylo prokázáno, že pozorovaná flokulační fáze je totožná s Whitesideovým fenoménem. Se zřetelem k uvedeným zjištěním byl vypracován postup a klíč k posuzování positivity reakce Mastitis testu-NK s čerstvě nadojeným mlékem, vycházející z gelifikační fáze reakce. Klíčem udané stupně positivity byly kalibrovány kvantitativními metodami. Počet buněčných elementů (stanovený elektronicky) a obsah deoxyribonukleové kyseliny (stanovený difenylaminovou reakcí) činil u negativních vzorků: $284\,500 \pm 91\,650/\text{ml}$ a $3,01 \pm 0,65 \mu\text{g}/\text{ml}$; u dubiozních vzorků: $366\,420 \pm 129\,810/\text{ml}$ a $4,93 \pm 1,08 \mu\text{g}/\text{ml}$; u jednokřížkových: $659\,640 \pm 230\,700/\text{ml}$ a $9,64 \pm 3,14 \mu\text{g}/\text{ml}$; u dvoukřížkových: $1\,617\,550 \pm 521\,310/\text{ml}$ a $18,99 \pm 7,68 \mu\text{g}/\text{ml}$; u tříkřížkových: $7\,546\,470 \pm 4\,993\,470/\text{ml}$ a $132,77 \pm 117,80 \mu\text{g}/\text{ml}$.

skot; mastitis; diagnóza; rychlé testy; hodnocení; buněčný obsah mléka; obsah deoxyribonukleové kyseliny

V roce 1957 publikovali Schalm a Noorlander (1957) významný nález. Zjistili, že povrchově aktivní látky typu alkyl-arylsulfonátu mají schopnost vytvářet s mlékem od krav postižených subklinickou mastitidou Whitesideův fenomén. Své zjištění prakticky aplikovali jako California mastitis test (dále CMT). Na principu této reakce pak řada autorů vyvinula analogické stájové testy pro diagnostiku subklinických mastitid. Tak byl v Československu popsán Laxem (1963) Dubatest, Slaninou a Konrádem (1964) AA – SS a AA – TEA testy a Neumanem (1966) Mastitis test – NK (dále MT–NK). Poslední z uvedených testů byl firmou Bioveta, Ivanovice na Hané, uveden do výroby.

Kompozice MT–NK se od CMT liší tím, že je užito jako detergentu Abesonu TEA, louh sodný se přidává k dosažení pH $7,6 \pm 0,2$ a jako indikátoru pH je užito fenolové červeně.*)

* Ministerstvo zemědělství a výživy: Technická podmínka Mastitis test-NK. TP číslo 203, 1969.

Z původní práce Schalma a Noorlandera (1957) je zřejmé, že autoři CMT rozlišili dvě za sebou následující fáze reakce, které můžeme nazvat fází gelifikační a fází flokulační. Za základ pro klíč k posuzování pozitivity testu zvolili projevy druhé, flokulační fáze reakce (tab. I).

I. Klíč k posuzování CMT, zveřejněný Schalmem a Noorlanderem (1957) a Schalmem (1960)

Stupeň pozitivity	Schalm a Noorlander (1957)	Schalm (1960)
Negativní (—)	směs zůstává tekutá, bez náznaků tvorby precipitátu	směs zůstává tekutá, bez náznaků změny konsistence nebo tvorby šlírů ⁺
Dubiózní (T)	slabá precipitace, která má tendenci vymizet při kontinuálním pohybu testovací palety	lehká změna konsistence, eventuálně lehká tvorba šlír, kterou je možno nejlépe pozorovat, když se testovací paleta pomalu střídavě naklání dolů a nahoru; tato reakce má tu vlastnost, že se za určitý čas rozpouští
Slabě pozitivní (1)	zřetelná precipitace, ale bez tendence k tvorbě gelu	silnější tvorba šlír, ale bez tendence k tvorbě gelu; u některých vzorků může být i tato reakce reversibilní
Výrazně pozitivní (2)	směs se okamžitě zahušťuje s náznakem tvorby gelu; při kroužení směs směřuje k pohybu uprostřed misky, ponechávajíc volné okraje dna misky; jakmile pohyb ustává, směs se rozlévá a pokrývá dno misky	směs se okamžitě zahušťuje, gel se tvoří v mírném stupni; při krouživých pohybech testovací palety má směs tendenci se shlukovat uprostřed misek, okraj dna zůstává prostý směsí; při ustání krouživých pohybů rozdělí se směs rovnoměrně a pokryje celé dno
Silně pozitivní (3)	tvoří se výrazný gel, který má tendenci adherovat ke dnu misky a při krouživých pohybech se tvoří výrazný centrální hrbolek	silná změna konsistence, tvorba gelu, která má za následek konvexitu povrchu směsi, obvykle se rovněž směs po zastavení pohybů sbluže, vytvářejíc hrbolek uprostřed misky; viskozita směsi je tak vysoká, že i když jsou testovací misky v klidu, není gelem pokryto celé dno

⁺ Šlír — sklovina jiného chemického složení, rozptýlená v základním skle ve tvaru nití, provazů, šmouh apod. Liší se i fyzikálními vlastnostmi a na základě rozdílů indexu lomu ji lze pozorovat okem. Vzniká při tavení nedokonalým zhomogenizováním, odtěkáním některých složek z povrchu skloviny a otavením záruvzdorného materiálu aj. Šliry jsou vzhledovou vadou skla a zhoršují i jeho mechanickou vlastnost. — Technický náučný slovník, SNTL Praha, 1963, str. 658.

Proti tomu z popisu stupňů pozitivity v klíči, který zveřejnil později sám Schalm (1960) (tab. I), vyplývá, že použil za základ posuzování pozitivity projevů gelifikační fáze reakce.

Rozdílnost v této základní otázce nalézáme i u jiných autorů. Tak například Drury a Reed (1961) se přidržují při modifikaci klíče projevů flokulace, zatímco Crewe (1956) ve svém klíči vychází z fáze gelifikační.

Můžeme konstatovat, že formulace klíče k posuzování CMT není ustálena. Někteří autoři, jako Drury a Reed (1961), Schneider a Jasper (1964), Crewe (1965) a Schultze a Smith (1966) klíč

modifikovali, jiní, jako Smith a Schultze (1966), Miller a Kearns (1967), upozornili na potíže s jeho interpretací.

Neuman (1966) doporučil používat při posuzování pozitivity MT—NK klíče sestaveného Schalmem a Noorlanderem (1957) i klíče publikovaného později samotným Schalmem (1960) (tab. I).

Naproti tomu návod k použití MT—NK se dotýká posuzování pozitivity testu následující formulací: „Pozitivní reakce se projeví výraznou tvorbou vloček, vláken až gelu. Při silně pozitivních reakcích se po ustání směsi gel sbaluje do centra misky.“*)

S MT—NK pracujeme již řadu let. Na základě rozsáhlého souboru čtvrtvých vyšetření provedených bezprostředně před nasazením strukových násadců v průběhu ranního dojení jsme zjistili, že čerstvě nadojené mléko vykazuje s MT—NK jen gelifikační fázi reakce.

Rozpornost literárních údajů, diskrepance, které se objevily při praktickém užívání testu a snaha o omezení subjektivní chyby nás přiměly zabývat se problematikou posuzování pozitivity MT—NK. V tomto příspěvku referujeme o dosažených výsledcích.

MATERIÁL A METODY

MECHANISMUS REAKCE

Po zjištění, že čerstvě nadojené mléko vykazuje s MT—NK jen gelifikační fázi reakce, zaměřili jsme svoji pozornost na reakci MT—NK s mlékem skladovaným. Nadojený vzorek mléka jsme rozdělili na dvě části, každou jsme posoudili Mastitis testem — NK, načež jsme jednu uložili do chladničky při 4 °C, druhou při pokojové teplotě. Vyšetření Mastitis testem — NK jsme opakovali po 24 a 48 hodinách. Takto jsme vyšetřili celkem 48 vzorků mléka.

Když jsme zjistili, že vzorky mléka skladované v chladničce i při pokojové teplotě vykazují jak gelifikační, tak flokulační fázi reakce, rozhodli jsme se ověřit totožnost flokulační fáze s Whitesideovým fenoménem, tedy s projevem reakce, který Schalm a Noorlander (1957) zvolili za základ k posuzování pozitivity. Zopakovali jsme proto Schalmův a Noorlanderův pokus, kterým objasnili význam přítomnosti mléčného tuku pro výskyt Whitesideova fenoménu. Jako reagens jsme však použili MT—NK.

Mastitis testem — NK na jeden křížek pozitivní čerstvě nadojené mléko jsme centrifugovali při 1800 otáčkách/min po dobu 20 minut. Tukovou vrstvu jsme odstranili a stáhli odstředěné mléko, aniž byl rozrušen sediment. MT—NK jsme testovali jednak odstředěné mléko s resuspendovaným sedimentem, jednak sediment resuspendovaný v destilované vodě.

Konečně, abychom prokázali, že výskyt flokulační fáze reakce podmiňuje přítomnost skladované tukové vrstvy, udělali jsme následující pokus. Mastitis testem — NK negativní vzorek jsme skladovali 48 hodin v chladničce. Pak jsme odebrali na jeden křížek pozitivní vzorek mléka. Čerstvě nadojený vzorek jsme rozdělil na dvě části. Skladovaný vzorek negativního mléka a obě části čerstvě nadojeného pozitivního mléka jsme centrifugovali 20 minut při 1800 otáčkách/min. Přitom byl vzorek skladovaného mléka chlazen ledovou drtí. Pak jsme nahradili tukovou vrstvu jedné části čerstvého pozitivního mléka tukovou

* Bioveta, Ivanovice na Hané: Návod k použití Mastitis testu—NK

vrstvou negativního skladovaného vzorku. Konečně jsme roztřepali jak vzorek čerstvého mléka, tak vzorek čerstvého mléka s tukovou vrstvou, pocházející ze skladovaného vzorku, a s oběma provedli MT — NK.

POSTUP A KLÍČ K POSUZOVÁNÍ REAKCE MT-NK

Na základě laboratorních nálezů a praktických zkušeností jsme vypracovali postup a pětistupňový klíč k posuzování reakce MT—NK s čerstvým mlékem, založený na projevech gelifikační fáze.

KALIBRACE STUPŇŮ POZITIVITY KVANTITATIVNÍMI METODAMI

Stupně positivity, definované vypracovaným klíčem, jsme kalibrovali jednak elektronickým stanovením počtu buněčných elementů, a to námi modifikovanou Tolleho metodou a stanovením obsahu deoxyribonukleové kyseliny reakcí s difenylaminem podle Burtona (1956), které k obdobným účelům použili Hauke (1967) a Hutjens a Schultz (1969).

Elektronické stanovení počtu buněčných elementů mléka

Stabilizaci vzorků jsme dosáhli přidáním 10% formalinu v poměru 1 : 250 (přefiltrovaného přes porcelánový filtr G-4). Ke zředovacímu mediu (na 100 ml media: 86 ml elektrolytu, 2 ml Tritonu X 100 a 12 ml denaturovaného etylalkoholu), zahřátému na 55—60 °C, jsme přidali v poměru 1 : 80 stabilizované vzorky mléka. Pak jsme inkubovali 15 minut při 80 °C. Vzorky jsme po vyjmutí z lázně vychladili na pokojovou teplotu a do tří hodin po vychlazení spočítali na přístroji Celloscope 101. Pracovali jsme s hodnotou diskriminátoru 110, regulátoru napětí 79,5 a s kapilárou 70. Ke kalibraci stupňů positivity jsme užili 227 vzorků.

Stanovení obsahu deoxyribonukleové kyseliny

2 ml mléka byly hydrolyzovány s 2 ml 10% kyseliny chloristé ve vodní lázni při 70 °C 15 minut a po odstředění a filtraci byly k 2 ml filtrátu přidány 2 ml difenylaminového reagens (1,5 g difenylaminu + 100 ml ledové kyseliny octové + 1,5 ml koncentrované kyseliny sírové + 0,1 ml vodného roztoku acetylaldehydu 16 mg/ml). Pak jsme inkubovali po dobu 18 až 20 hodin při 30 °C. Po filtraci jsme odečítali extinkci vzorků na fotoelektrickém kolorimetru Spektromom 202 při 595 nm v 10 mm kyvetách. Zároveň se zpracovával slepý vzorek. Získané hodnoty se odečítaly z kalibrační křivky sestavené z extinkcí standardního roztoku kyseliny deoxyribonukleové. Ke kalibraci stupňů positivity bylo užito 160 vzorků.

Ze získaných hodnot kvantitativních metod byly vypočítány pro jednotlivé stupně positivity aritmetické průměry a směrodatné odchylky.

VÝSLEDKY

MECHANISMUS REAKCE

Při studiu vlivu skladování vzorků mléka na průběh reakce se potvrdilo naše zjištění, že čerstvě nadojené mléko, odebrané na začátku dojení, vykazuje s MT—NK jen gelifikační fázi reakce. Dále jsme zjistili, že skladované mléko vykazuje jak gelifikační, tak flukolační fázi reakce. Flukolační reakce byla výraznější u vzorků skladovaných v chladničce.

Abychom prokázali, že se jedná skutečně o flukulační fázi, tedy o výskyt Whitesideova fenoménu, zopakovali jsme pokus provedený Schalmem a Noorlanderem s následujícími výsledky.

Odstředěné mléko vykazovalo jen slabou gelifikační reakci. Sediment z pozitivního mléka, resuspendovaný v odstředěném mléce, dával výraznou gelifikační reakci, aniž by byly patrné známky flokulace. Sediment resuspendovaný v destilované vodě dával rovněž jen gelifikační fázi reakce, jejíž intenzita však byla poněkud slabší než u sedimentu resuspendovaného v odstředěném mléce. Přitom v obou zmíněných případech bylo možné pozorovat při bedlivém prohlížení velmi jemné bezbarvé částice podobné prachovým, patrné jen proti černému pozadí. Částice se tvořily současně se slábnutím intenzity gelifikační fáze.

Pokus, kterým jsme se snažili prokázat, že skladovaná tuková vrstva podmiňuje výskyt flokulační fáze, přinesl následující výsledky. Centrifugovaný a znovu roztřepaný vzorek čerstvě nadojeného mléka, pozitivního na jeden křížek, vykazoval toliko gelifikační fázi reakce. Proti tomu též vzorek čerstvě nadojeného mléka, u kterého však byla tuková vrstva nahrazena tukovou vrstvou z negativního skladovaného vzorku, vykazoval výraznou flokulační fázi reakce, tedy zřetelný výskyt Whitesideova fenoménu.

Získané výsledky jsou analogické s nálezy Schalma a Noorlandera. Na základě toho uzavíráme, že flokulační fáze, kterou jsme pozorovali u skladovaného mléka, je totožná s Whitesideovým fenoménem.

Zmíněná terénní i laboratorní pozorování nás přivedla k závěru vypracovat klíč k posuzování reakce čerstvě nadojeného mléka s MT—NK na základě projevů gelifikační fáze reakce.

POSTUP A KLÍČ K POSUZOVÁNÍ REAKCE MT-NK S ČERSTVĚ NADOJENÝM MLÉKEM

Vypracovali jsme následující postup posuzování reakce:

- A — v šikmo dopadajícím světle při pomalém sklápění testační palety ve směru od sebe a k sobě (přitom zaměřujeme pozornost na dno misky odkrývajících se za stékající směsí);
- B — v kolmém pohledu za současného sklápění palety ve směru od sebe a k sobě (přitom si všímáme rovněž dna misky odkrývajících se za stékající směsí);
- C — v kolmém pohledu při krouživém pohybu s paletou v horizontální rovině (přitom pozorujeme rozprostření reakční směsi po dně misky);
- D — v šikmo dopadajícím světle při misce v klidu (přitom pozorujeme povrch hladiny reakční směsi).

Podstatou stanovení stupně positivity je postihnout následující typické příznaky v jednotlivých pozicích posuzování:

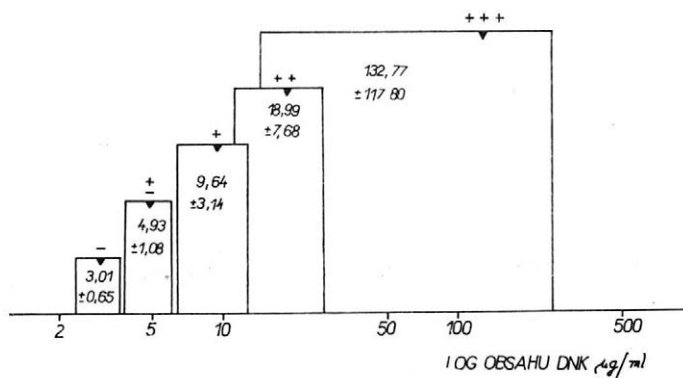
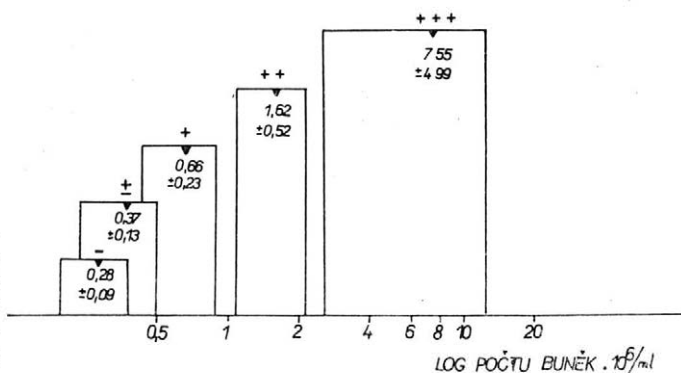
- A — po dně misky stékající reakční směs následuje pomaleji tekoucí zvlněný film;
- B — po dně misky stékající reakční směs následuje závojevitý film;
- C — reakční směs se při krouživých pohybech s paletou sbaluje uprostřed misky;
- D — hladina směsi po uklidnění krouživých pohybů tvoří reliéf.

Klíč k posuzování positivity MT—NK shrnuje obr. 1.

POZICE A ZPŮSOB POSUZOVÁNÍ	STUPĚŇ POZITIVITY				
	0	±	+	++	+++
V ŠIKMO DOPADAJÍCÍM SVĚTLE SKLÁPĚNÍ MISKY		ZVLNĚNÝ FILM			
V KOLMÉM POHLEDU SKLÁPĚNÍ PALETY			ZÁVOJOVITÝ FILM		
V KOLMÉM POHLEDU KROUŽIVÝ POHYB PALETU				SMĚS SE SBALUJE	
V ŠIKMO DOPADAJÍCÍM SVĚTLE PALETA V KLIDU					HLADINA TVOŘÍ RELIEF

1. Klíč k posuzování pozitivit MT-NK
Podrobnou dokumentaci typických příznaků pozitivit poskytuje film „Mastitis test - NK“ vyrobený ve spolupráci Laboratoře vědeckého filmu ČSAV a Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně

2. Logaritmus aritmetických průměrů a směrodatných odchylek počtu buněk u jednotlivých stupňů pozitivit MT-NK (—; ±; +; ++; +++)



3. Logaritmus aritmetických průměrů a směrodatných odchylek obsahu deoxyribonukleové kyseliny (DNK) u jednotlivých stupňů pozitivit MT-NK (—; ±; +; ++; +++)

Získané výsledky hodnot aritmetických průměrů a směrodatných odchylek pro jednotlivé stupně positivity shrnuje obr. 2, udávající počet buněčných elementů, a obr. 3, udávající obsah deoxyribonukleové kyseliny v 1 ml mléka.

DISKUSE

Mechanismem reakce CMT se zabývali Carroll a Schalm (1962), Christ (1962), Nageswararao a Derbyshire (1969, 1970). Žádný z uvedených autorů však neřešil otázku vlivu skladování vzorků mléka na projev flokulační fáze reakce.

O modifikaci klíče k posuzování positivity CMT se pokusili Drury a Reed (1961), Schneider a Jasper (1964), Crewe (1965) a Schultze a Smith (1966). Neřešili však přitom základní otázku výskytu dvou fází reakce, jejichž projevy jsou pro vypracování klíče nejpodstatnější.

Skutečnost, že flokulační fáze reakce je podmíněna skladováním vzorku mléka a není tedy možné jejich projevů použít při posuzování positivity reakce MT—NK s čerstvě nadojeným mlékem, považujeme za důvod, proč Schalm (1960), jeden z autorů CMT, opustil původně vypracovaný klíč a publikoval klíč vycházející z projevů gelifikační fáze reakce.

Žádný z publikovaných postupů posuzování nespécifikoval způsob odečítání reakcí. To bylo bezesporu zdrojem potíží s interpretací jednotlivých stupňů positivity, na což upozornili Smith a Schultze (1966) a Miller a Kearns (1967).

Námi doporučeným způsobem posuzování a klíčem ke stanovení positivity MT—NK chceme napomoci ke zkvalitnění práce s testem, o jehož pozitivních vlastnostech již podali zprávy Nemeš a Gamčík (1966) a Filipovič (1969).

Technická spolupráce: L. Pešková, J. Pospíšil

Literatura

- BURTON K., 1956, A study of conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62 : 315–323.
- CARROLL E. S., SCHALM O. W., 1962, Effect of deoxyribonuclease on the California test for mastitis. *J. Dairy Sci.* 45 : 1094–1097.
- CHRIST W., 1962, Über das Reaktionsvermögen von Proteinen mit synthetischen Netzmitteln als Grundlage zum Verständnis des California-Mastitis-Testes. *Dtl. tierärztl. Wschr.* 69 : 108–110.
- CREWE G., 1965, The reliability CMT as a field test for leucocytes in milk. *J. S. Afr. vet. med. Ass.* 36 : 503–506.
- DRURY A. R., REED G. W., 1961, A hard irritation index using the California mastitis test. *Vet. Med.* 56 : 147–152.
- FILIPOVIČ M., 1969, Komparativno ispitivanje NK-testa i mastitisreagensa za otkrivanje poremećene sekrecije vimena. *Veterinaria, Sarajevo* : 231–235.
- HAUKE H., 1967, Weitere Untersuchungen über die Spezifität der Feulgen-Reaktion mit Milch und ihre Beziehungen zum Desoxyribonukleinsäuregehalt. *Milch-wissenschaft* 22 : 269–274.

- HUTJENS M. F., SCHULTZ L. H., 1969, Estimation of somatic cells in milk with a diphenylamine-deoxyribonucleic acid method. *J. Dairy Sci.* 52 : 912.
- LAX T., 1963, Dubatest — chemická zkouška v diagnostice mastitid u dojnic. *Veterinářství* 13 : 17-25.
- MILLER D. D., KEARNS J. V., 1967, Effectiveness of the California mastitis test as a measurement of the leucocyte content of quarter samples of milk. *J. Dairy Sci.* 50 : 683-686.
- NAGESWARARAO G., DERBYSHIRE J. B., 1969, Studies on the mechanism of gel formation in the California mastitis test reaction. *J. Dairy Res.* 36 : 359.
- NAGESWARARAO G., DERBYSHIRE J. B., 1970, Studies on the mechanism of the Whiteside mastitis test reaction. *J. Dairy Res.* 37 : 77-82.
- NEMEŠ D., GAMČÍK P., 1966, Vzťah NK-testu k bakteriologickému a cytologickému nálezu pri chronických mastitidách u kráv. *Folia Vet.* 10 : 215-223.
- NEUMAN K., 1966, Výzkum etiologie, diagnostiky, prevence a léčby mastitid. I. Mastitis test-NK jako rychlá stájová zkouška pro diagnózu sekrečních poruch mléčné žlázy. Dílčí závěrečná zpráva úkolu A-2-13-6/3, Brno : 77 s.
- SCHALM O. W., NOORLANDER D. O., 1957, Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J. Am. vet. med. Ass.* 130 : 199-204.
- SCHALM O. W., 1960, Ein neuer Mastitis-Test. *Tierärztl. Umsch.* 15 : 151-153.
- SCHNEIDER R., JASPER D. E., 1964, Standardization of the California mastitis test. *Am. J. vet. Res.* 25 : 1635-1641.
- SCHULTZE W. D., SMITH J. W., 1966, The cellular content of cows milk. II. Comparison of CMT and microscopic count for estimating cell concentrations in quarter samples. *J. Milk Fd Technol.* 29 : 126-129.
- SLANINA L., KONRÁD V., 1964, Príspevok k terénnej a laboratornej diagnostike mastitid. I Použitie povrchovo aktívnych látok v terénnej diagnostike mastitid. *Veterinářství* 14 : 506-509.
- SMITH J. W., SCHULTZE W. D., 1966, The cellular content of cows milk. I. An evaluation of the CMT as a method of estimating the number of cells in milk. *J. Milk Ed. Technol.* 29 : 84-97.

Došlo dne 19. 3. 1971

РЫШАНЕК Д., РЕНДА В. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Механизм реакции Мастит-NK теста и способ оценки его положительности. *Вет. Мед. (Прага)* 16 (7) : 405-414, 1971.

На основе наблюдений и лабораторного исследования было установлено, что свеженадоенные пробы молока, взятые Мастит тестом - NK показывают только гелификационную фазу реакции. Появление флокуляционной фазы обусловлено хранением проб и зависит от наличия молочного жира. Было доказано, что наблюдаемая флокуляционная фаза тождественна с феноменом Вайтсайда. С учетом приведенных фактов был разработан метод и ключ для оценки положительной реакции Мастит теста - NK у свеженадоенного молока, вытекающей из гелификационной фазы реакции. При помощи ключа установленные степени позитивности были калиброваны количественными методами. Количество клеточных элементов (определенное электронически) и содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты (определенное при помощи дифениламиновой реакции) составляло у отрицательных проб: $284.500 \pm 91.650/\text{ml}$ и $3,01 \pm 0,65 \mu\text{g}/\text{ml}$; у сомнительных проб: $366.420 \pm 129.810/\text{ml}$ и $4,93 \pm 1,08 \mu\text{g}/\text{ml}$; у проб с одним крестиком: $659.640 \pm 230.700/\text{ml}$ и $9,64 \pm 3,14 \mu\text{g}/\text{ml}$; у проб с двумя крестиками: $1617.550 \pm 521.310/\text{ml}$ и $18,99 \pm 7,68 \mu\text{g}/\text{ml}$; у проб с тремя крестиками: $7546.470 \pm 4993.470/\text{ml}$ и $132,77 \pm 117,80 \mu\text{g}/\text{ml}$.

крупный рогатый скот; мастит; диагноз; быстрые тесты; оценка; клеточное содержание молока; содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты

RYŠÁNEK D., RENDA V. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). *Mechanism of the Mastitis Test-NK Reaction and the Method of the Evaluation of its Positivity.* *Vet. Med. (Praha)* 16 (7) : 405-414, 1971.

It has been revealed on the basis of observation and laboratory examination that freshly obtained milk samples collected immediately before milking and instantly examined by the Mastitis Test-NK show only the gellification stage of the reaction.

The occurrence of the flocculation stage is conditioned by the storage of the sample and underlied by the presence of the milk fat. It has been demonstrated that the observed flocculation stage is identical to the Whiteside phenomenon. The procedure and the key to the evaluation of the positivity of the Mastitis Test-NK reaction with freshly obtained milk based on the gellification stage of the reaction were developed with respect to the mentioned observations. The positivity degrees determined by the key were calibrated by objective methods of quantitative nature. The number of the cell elements (determined electronically) and the content of deoxyribonucleic acid (determined by the diphenylamine reaction) were the following in the negative samples: $284.500 \pm 91.650/\text{ml}$ and $3.01 \pm 0.65 \mu\text{g}/\text{ml}$ in dubious samples: $366.420 \pm 129.810/\text{ml}$ and $4.93 \pm 1.08 \mu\text{g}/\text{ml}$ in single-cross samples: $659.640 \pm 230.700/\text{ml}$ and $9.64 \pm 3.14 \mu\text{g}/\text{ml}$ in two-cross samples: $1617.550 \pm 521.310/\text{ml}$ and $18.99 \pm 7.68 \mu\text{g}/\text{ml}$ in three-cross samples: $7546.470 \pm 4993.470/\text{ml}$ and $132.77 \pm 117.80 \mu\text{g}/\text{ml}$

cattle; mastitis; diagnosis; quick tests; evaluation; cellular content of milk; deoxyribonucleic acid content

RYŠÁNEK D., RENDA V. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Reaktionsmechanismus des NK-Mastitis-Testes und Beurteilungsart deren Positivität*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 405-414, 1971.

Auf Grund der Beobachtungen und der Laboruntersuchung wurde festgestellt, daß die unmittelbar vor dem Melken entnommenen und sofort mittels NK-Mastitis-Test untersuchten frisch angemolkenen Milchproben nur eine Gelifikationsreaktionsphase aufweisen. Das Vorkommen der Ausflockungsphase wird durch die Probenlagerung bedingt und an die Anwesenheit des Milchfetts gebunden. Es wurde nachgewiesen, daß die beobachtete Ausflockungsphase mit dem Whiteside-Phänomen identisch ist. Mit Rücksicht auf die angeführten Feststellungen wurde der Vorgang und der Schlüssel zur Beurteilung der Reaktionspositivität des NK-Mastitis-Testes mit frisch gemolkener Milch, herausgehend aus der Gelifikationsphase der Reaktion ausgearbeitet. Die mittels Schlüssel angeführten Positivitätsstufen wurden durch quantitative Methoden kalibriert. Die Anzahl der Zellelemente (elektronisch bestimmt) und der Gehalt an Deoxyribonukleinsäure (mittels Diphenylaminreaktion bestimmt) betrug bei den negativen Proben: $284.500 \pm 91.650/\text{ml}$ und $3.01 \pm 0.65 \mu\text{g}/\text{ml}$; bei dubiosen Proben: $366.420 \pm 129.810/\text{ml}$ und $4.93 \pm 1.08 \mu\text{g}/\text{ml}$; bei einkreuzigen: $659.640 \pm 230.700/\text{ml}$ und $9.64 \pm 3.14 \mu\text{g}/\text{ml}$; bei zweikreuzigen: $1617.550 \pm 521.310/\text{ml}$ und $18.99 \pm 7.68 \mu\text{g}/\text{ml}$; bei dreikreuzigen: $7546.470 \pm 4993.470/\text{ml}$ und $132.77 \pm 117.80 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Rind; Mastitis; Diagnose; rasche Teste; Bewertung; Milchzellengehalt; Gehalt an Deoxyribonukleinsäure

RYŠÁNEK D., RENDA V. (Institut de recherches de la médecine vétérinaire, Brno, Tchécoslovaquie). *Mécanisme de la réaction du test Mastitis — NK et manière d'appréciation de sa positivité*. Vet. Med. (Prague) 16 (7) : 405-414, 1971.

Sur la base des observations et des explorations de laboratoire il a été identifié que les échantillons de lait fraîchement recueillis immédiatement avant la traite et instantanément examinés au moyen du test Mastitis — NK, n'accusent que la phase de gélification de la réaction. L'apparition de la phase de floculation est conditionnée par le stockage de l'échantillon et liée à la présence de la graisse laitière. Il a été prouvé que la phase de floculation observée et le phénomène de Whiteside sont identiques. Etant donné les constatations mentionnées, on a élaboré le procédé et la clef de détermination de la positivité de la réaction du test Mastitis — NK avec le lait fraîchement traité, partant de la phase de gélification de la réaction. Les taux de positivité, établis par la clef, étaient calibrés en appliquant les méthodes quantitatives. Le nombre d'éléments cellulaires — (établi par voie électronique) et la teneur en acide désoxyribonucléique (déterminée par la réaction avec la diphenylamine) s'élevaient chez les échantillons négatifs à: $284.500 \pm 91.650/\text{ml}$ et à $3.01 \pm 0.65 \mu\text{g}/\text{ml}$; chez les échantillons douteux: $366.420 \pm 129.810/\text{ml}$ et à $4.93 \pm 1.08 \mu\text{g}/\text{ml}$;

chez les échantillons à une croix: $659\,640 \pm 230\,700/\text{ml}$ et à $9,64 \pm 3,14 \mu\text{g}/\text{ml}$; chez les échantillons à deux croix: $1\,617\,550 \pm 521\,310/\text{ml}$ et à $18,99 \pm 7,68 \mu\text{g}/\text{ml}$; chez les échantillons à trois croix: $7\,546\,470 \pm 4\,993\,470/\text{ml}$ et à $132,77 \pm 117,80 \mu\text{g}/\text{ml}$.

bovins; mastite; diagnostic; tests rapides; appréciation; teneur cellulaire du lait; teneur en acide désoxyribonucléique

Adresa autorů:

MVDr. D. R y š á n e k, MVDr. V. R e n d a, Výzkumný ústav veterinárního lékařství.
Brno - Medlánky

ELEKTRICKÝ ODPOR MĚŘENÝ NA VAGINÁLNÍ SLIZNICI U GRAVIDNÍCH A NEGRAVIDNÍCH PRASNIC

J. Podaný, J. Muzikant, J. Čanderle

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

PODANÝ J., MUZIKANT J., ČANDERLE J. *Elektrický odpor měřený na vaginální sliznici u gravidních a negravidních prasnic.* Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 415-420, 1971.

U 46 prasnic, z toho u 31 zabřezlých plemenic, byly sledovány hodnoty elektrického odporu měřeného na vaginální sliznici v říji (při zapuštění či inseminaci) a za 21 a 42 dní na to. U zabřezlých prasnic byl zjištěn mezi hodnotami sledovaného kritéria, naměřenými v říji a po uplynutí 21 resp. 42 dní, průměrný rozdíl 41,1 resp. 39,5 ohmu, který je statisticky vysoce významný ($P < 0,001$). U nezabřezlých zvířat činil průměrný sledovaný rozdíl zkoumaného kritéria — 1,0 ohm; je staticky neprůkazný. Dynamika elektrofyziologických vaginálních hodnot, sledovaných u plemenic v průběhu prvních dvou třetin jejich gravidity, je charakterizována kolísavou tendencí, aniž by však došlo k jejich poklesu na úroveň hodnot zjišťovaných v estru. Byla potvrzena možnost využití hodnoty elektrického odporu měřeného na vaginální sliznici jako nového nepřímého objektivního kritéria prakticky použitelného k rané diagnostice gravidity prasnic.

dynamika elektrofyziologické hodnoty vaginální v průběhu gravidity; raná diagnostika březosti prasnic

Zvyšování plodnosti prasat, jako jednoho ze základních ukazatelů zdraví, užítkovosti a ekonomické rentability jejich chovů, je mimo jiné podmíněno i odstraňováním všech příčin prodlužujících neproduktivní období. Jednou z nich je i skutečnost, že jsou v našich chovech držena zvířata domněle březí.

Možnost časného stanovení gravidity u prasnic se tedy jeví jako závažný problém, který je neoddelitelnou součástí péče o plodnost prasat a základním předpokladem účinné kontroly celého reprodukčního procesu. Dokladem toho jsou rozsáhlé přehledy metod diagnostiky březosti prasnic, publikované např. Samborským (1961), Schätzem a Buschem (1963), Černým (1964) a Krausem (1967). Sem patří i práce našich autorů, např. Věžníka a kol. (1967), řešící otázky rané diagnostiky gravidity prasnic s možností praktického využití v rutinní diagnostice (např. na základě histologického vyšetření vaginální sliznice); Podaný a Muzikant (1967) pak uvádějí své poznatky o palpační rektální metodě a o metodě "non return testu". Převážná část zmíněných prací je věnována laboratorním diagnostickým metodám, dobře propracovaným, které však pro praktický provoz v zemědělském závodě nejsou vždy použitelné.

Zajímavé jsou práce některých autorů z posledního údobí (např. Rother 1969). Popisují zkušenosti s hormonální testací rané diagnostiky gravidity u prasnic, spočívající v podstatě na využití steroidních hormonů (androgenů a estrogenů).

V návaznosti na své předcházející práce o cykličnosti změn elektrického od-

poru vaginální sliznice v průběhu sexuálních cyklů plemenic (Podaný a kol. 1970, Podaný a Muzikant 1970) jsme přistoupili ke studiu tohoto kritéria i ve vztahu ke graviditě zapuštěných prasnic. Získané poznatky jsou předmětem této publikace.

MATERIÁL A METODY

Ke sledování elektrického odporu měřeného na vaginální sliznici bylo použito metodického postupu a technického vybavení, tj. střídavého přímo ukazujícího tranzistorového indikátoru s detekční sondou, popsaného v dřívějších pracích autorů (Podaný 1970, Podaný a kol. 1970).

Pozorovali jsme 46 zdravých chovných prasnic, vesměs plemene bílého ušlechtilého (BU), chovaných na farmě JZD Medlánky a z menší části ve stájových objektech VÚVL v Brně. Měření sledované elektrofyziologické hodnoty na vaginální sliznici v bezprostřední blízkosti *cervix uteri* bylo u těchto kusů opakováno vždy po uplynutí doby odpovídající délce pohlavního cyklu, tj. za 21 den, a v případě nepřeběhnutí (u zabřezlých prasnic) pak znovu za další tři týdny. U většiny sledovaných zvířat byl elektrický odpor sledován i v diestru, resp. v údobí mezi předpokládanými říjovými cykly. Gravidita sledovaných plemenic byla dodatečně potvrzena porodem.

Dosažené výsledky byly variačně statisticky vyhodnocovány s použitím postupu a symboliky podle Roda (1966); šlo jmenovitě o párový test, při němž $\bar{d}$ označuje sledovaný průměrný rozdíl a symbol P — hladinu významnosti.

VÝSLEDKY

U 46 prasnic byly vyhodnoceny hodnoty elektrického odporu měřeného na vaginální sliznici, zjištěné v období estru, tj. při připuštění či inseminaci a opakovaně sledované za 21 den (tj. po uplynutí doby odpovídající délce pohlavního cyklu). U zabřezlých 31 plemenic bylo měření opakováno ještě za dalších 21 dní, tj. za 6 týdnů po posledním zapuštění či inseminaci.

Získané průměrné hodnoty elektrického odporu vaginální sliznice u zabřezlých i u 15 nezabřezlých kusů jsou uvedeny v tab. I.

Vyhodnocení průměrného rozdílu mezi elektrofyziologickými hodnotami vaginálními u gravidních i negravidních plemenic je vyjádřeno v tab. II (s použitím párového testu). Průměrný rozdíl mezi hodnotami sledovaného kritéria u říjících se prasnic, zapuštěných či inseminovaných v období estru vymezeného na základě elektrofyziologické hodnoty vaginální a hodnotami téhož kritéria, zjištěnými u stejných zvířat po uplynutí 21 dne, tj. odpovídajícími trvání jednoho říjového cyklu, činí 41,1 ohmu (s rozpětím průměrných hodnot od 38,3 do 43,9 ohmu) — u zabřezlých plemenic ($P < 0,001$). U přeběhlých prasnic (po 21 dnu) činí tento rozdíl v průměru pouze — 1,0 ohm (s rozpětím průměrných hodnot od — 4,3 do 2,3 ohmu).

U gravidních prasnic byl zjištěn mezi hodnotami sledovaného kritéria, naměřenými v říji resp. při zapuštění či inseminaci, a hodnotami téhož kritéria po

I. Průměrné hodnoty elektrického odporu měřeného na vaginální sliznici v ohmech

Plemence	V estru	Za 21 den <i>p. c.</i>	Za 42 dny <i>p. c.</i>
Gravidní	60,8	101,9	99,3
Negravidní	64,4	63,4	—

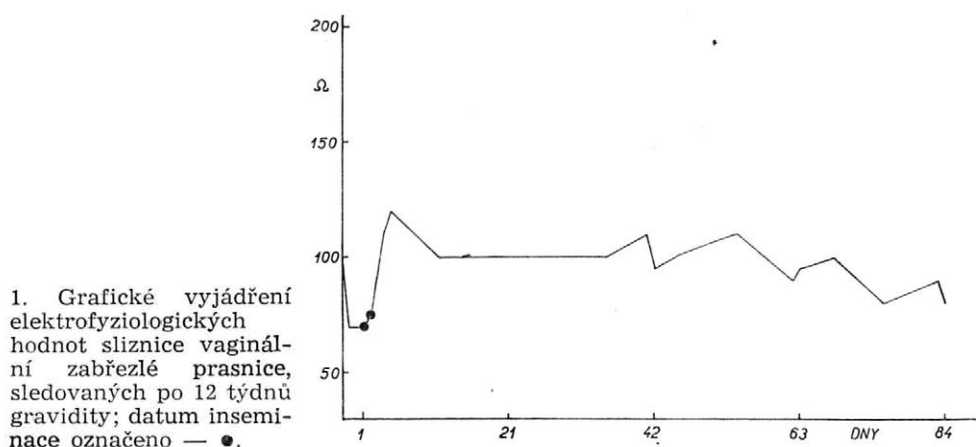
Vysvětlivka: *p. c.* = *post coitum*, tj. po připuštění resp. inseminaci

II. Test významnosti průměrného rozdílu mezi elektrofyziologickými hodnotami vaginálními v ohmech

Plemenice	Při připuštění — inseminaci a za 21 den p. c.		Při připuštění — inseminaci a za 42 dny p. c.	
	$\bar{d}$	významnost	$\bar{d}$	významnost
Gravidní Negravidní	41,1 -1,0	$P < 0,001$ neprůkazné	39,5 —	$P < 0,001$ —

uplynutí 42 dnů průměrný rozdíl 39,5 ohmu (s kolísáním od 36,8 do 42,2 ohmu). Tento průměrný rozdíl je rovněž statisticky vysce průkazný ($P < 0,001$).

Pro názornost jsou elektrofyziologické hodnoty vaginální, sledované v průběhu několika pohlavních cyklů, vyjádřeny u jedné zabřezlé prasnice a u druhé — přeběhlé za 21 den po první inseminaci — graficky (obr. 1 a 2). Z obr. 1

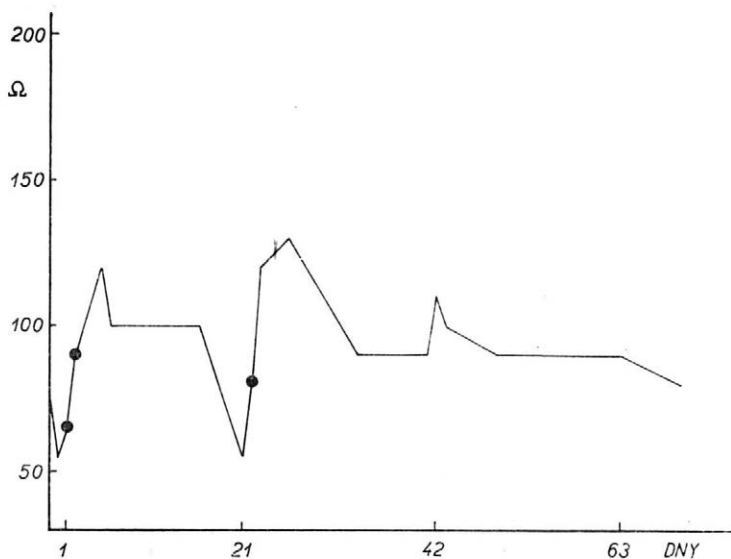


je patrný i průběh hodnot elektrického odporu vaginální sliznice, sledovaných u prasnice v období její gravidity, tj. konkrétně po 12 týdnů, což odpovídá údobí čtyř říjových cyklů — (obdobná pozorování proběhla celkem u 15 zvířat). Dynamika elektrofyziologických hodnot je v tomto případě charakterizována kolísavou tendencí, aniž by došlo k jejich poklesu na úroveň hodnot zjišťovaných v estru.

DISKUSE

Zůstává nesporné, že nejvěrohodnějším průkazem výsledků úspěšné koncepce plemenice je porod.

Požadavky praxe na získání spolehlivé metody umožňující detekci estru i ranou diagnostiku gravidity je však nutné považovat za pochopitelné a oprávněné. Dosavadní metody, kritéria nebo testy biochemické či jiné povahy jsou především pro svůj laboratorní charakter pro zemědělskou praxi obtížně použitelné — (např. průkaz estrogenu v moči březích prasníc, jak uvádí Rommel [1962] a Věžník a kol. [1967] a další). Histobiopické vyšetření vaginální sliznice je pak ve své konečné fázi rovněž vázáno na laboratoř (Věž-



2. Elektrický odpor sliznice vaginální sledovaný u prasnice v průběhu estrálního cyklu a v prvních týdnech gravidity; datum inseminace označeno — •

ník a kol. [1967]). Palpatorické srovnání tloušťky *arteria uterina media* s *arteria iliaca externa* lze sice pro praxi doporučit, ale pouze jako metodu bez nároku na ranost průkazu gravidity (Čerňe [1964], Podaný a Muzikant [1967]).

Kritéria pro metodu rané diagnostiky březosti jsou tato: musí být použitelná co nejdříve po koncepci a musí být spolehlivá; musí být pro graviditu nezávadná, tj. nesmí poškozovat ani matku ani plody; musí být i technicky i materiálně zvládnutelná.

V našem případě nás přivedly na myšlenku využití hodnot elektrického odporu měřeného na vaginální sliznici — jako nepřímého kritéria úspěšného zabřeznutí — poznatky, získané při studiu dynamiky této hodnoty u prasnic v průběhu pohlavních cyklů před inseminací a po ní, resp. po zapuštění.

Ze statistického zhodnocení dosažených výsledků plyne, že zjistíme-li u prasnice za 21 den po inseminaci zmíněnou elektrofyziologickou hodnotu vaginální nejméně o 38 ohmů vyšší, lze potom s velkou pravděpodobností usuzovat na její graviditu.

U souboru 31 sledované a zabřezlé prasnice byl rozdíl hodnot elektrického odporu vaginální sliznice, zjištěných při inseminaci či zapuštění a za 21 den po ní, jen u 25,8 % případů nižší než zmíněných 38 ohmů — ($\bar{d}-1s$); umožnilo tedy použité kritérium určit spolehlivě ranou diagnózu gravidity už po prvním říjovém cyklu cca u 75 % případů. U sledovaných nezabřezlých 15 kusů nebylo dosaženo ani v jednom případě hodnoty rozdílu ve výši 38 ohmů.

Ke zvýšení spolehlivosti uvedeného kritéria k rané diagnostice gravidity přispívá další opakované měření elektrického odporu vaginální sliznice u týchž zvířat za dalších 21 dní a případně častější sledování zmíněné hodnoty v období možného přeběhnutí prasnice (tj. 19.—22. den po zapuštění či inseminaci). Tímto postupem lze postihnout případnou individualitu některých zvířat v délce trvání jejich říjového cyklu.

V této souvislosti je nutné rovněž uvést, že jsme zjistili u části zvířat sledovaného souboru nejnižší hodnotu elektrického odporu na sliznici vaginální jeden den před projevem reflexu nehybnosti, charakterizujícím vlastní říji; u těchto zvířat se hodnota elektrického odporu na začátku vlastního estru (tj. následující den) vždy poněkud zvýšila — viz obr. 2. Uvedený poznatek je v soulase s našimi dřívějšími výsledky (PODANÝ a MUZIKANT [1970]).

Opakované sledování eventuální říje je na základě elektrofyziologické hodnoty vaginální — ve shora zmíněných termínech — má tedy praktický význam spočívající především v kontrole průběhu pohlavního cyklu a umožňuje včasnou detekci říje u přebíhajících se plemenic i v případech, kdy probíhá s nedostatečně intenzivními klinickými příznaky. Současně umožňuje popsání metoda ranou diagnostiku březosti. Jde tedy o nové nepřímé kritérium testace gravidity, použitelné v praxi a objektivnější než např. "non return test".

Sledování dynamiky elektrofyziologické hodnoty vaginální sliznice u prasníc v průběhu jejich gravidity ukázalo, že je charakterizována kolísavou tendencí, aniž by však došlo k jejímu poklesu na úroveň hodnot zjištěných v estru.

U tří prasníc byly sledovány zmíněné hodnoty i v období posledních tří týdnů před porodem; hodnoty elektrického odporu vaginální sliznice měly v tomto případě klesající tendenci; dva resp. tři dny před porodem dosáhly hodnot minimálních, tj. byly na úrovni hodnot zjištěných v estru.

Závěrem rozvahy nad výsledky je možné konstatovat, že v naší práci byla potvrzena možnost využití hodnot elektrického odporu měřeného na vaginální sliznici jako nového nepřímého objektivního kritéria, prakticky použitelného k rané diagnostice gravidity prasníc.

Literatura

- ČERNE F., 1964, Utvrdivanje bredosti kod svinja. Vet. Glasnik 18 : 549-554.
 KRAUS D., 1967, Diagnostika březosti u prasníc. Studijní informace — veterinářství 1 : 1-48.
 PODANÝ J., 1970, Nová biofyziální metoda detekce estru. Veterinářství 20 : 225-227.
 PODANÝ J., MUZIKANT J., 1967, Rektální diagnostika gravidity u prasníc. Veterinářství 17 : 549-552.
 PODANÝ J., MUZIKANT J., 1970, Cyklické změny elektrického odporu měřeného na vaginální sliznici krav a jalovic v průběhu pohlavního cyklu. Vet. Med. (Praha) 11-12 : 671-680.
 PODANÝ J., MUZIKANT J., DOŇAR B., STANĚK F., 1970, Elektrický odpor měřený na vaginální sliznici u krav, prasníc, koz a ovcí. Vet. Med. (Praha) 8 : 497-502.
 ROD J., 1966, Statistika. Základy biometriky. Praha : 126 s.
 ROMMEL P., 1962, Untersuchungen zum chemisch-hormonalen Trächtigkeitsnachweis beim Schwein. Mh. Vet. Med. 17 : 918-931.
 ROTHE K., 1969, Organizace reprodukce v chovech prasat v NDR. Symposium o možnostech intenzifikace výroby vepřového masa v rámci ozdravování chovů prasat. VŠV Brno.
 SAMBORSKI Z., 1961, Proby okrešľania ciažy u macior metodami biologicznymi. Med. Vet. 17 : 411-416.
 SCHÄTZ F., BUSCH W., 1963, Zum Stand der Trächtigkeitsdiagnose beim Schwein. Mh. Vet. Med. 18 : 499-503.
 VĚŽNÍK Z., DVOŘÁK M., HRONOVÁ B., LOJDA L., MELICHAR B., MUZIKANT J., PODANÝ J., 1967, Raná diagnostika gravidity prasníc. Závěrečná zpráva úkolu R II — 26/2, VÚVL Brno : 64 s.

Došlo dne 8. 2. 1971

ПОДАНЫ Й., МУЗЫКАНТ Й., ЧАНДЕРЛЕ Й. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Электросопротивление, замеренное на вагинальной слизистой у супоросных и несупоросных свиней. Вет. Мед. (Прага) 16 (7) : 415-420, 1971.

У 46 свиноматок, в том числе 31 супоросной, изучали величины электросопротивления, замеренного на вагинальной слизи во время охоты (при случке или осеменении), а также спустя 21 и 42 дней. Среди величин изучаемого критерия, вычисленных в период охоты и спустя 21 или 42 дней, установлена средняя разница 41,1 и 39,5 ома, которая статистически высокозначима ($P < 0,001$). У несупоросных животных средняя разница этого критерия составила 1,0 ома; разница статистически недостоверна. Динамика электрофизиологических вагинальных величин, изучаемых у маток в ходе первых двух третей их супоросности, отличается отклонениями, но они не падают ниже уровня величин, установленных в период эструса. Подтверждена возможность использования величины электросопротивления, замеренного на вагинальной слизи, как нового косвенного объективного критерия, которым можно на практике пользоваться для раннего диагностирования супоросности маток.

динамика электрофизиологической вагинальной величины в процессе супоросности; ранняя диагностика супоросности маток

PODANÝ J., MUZIKANT J., ČANDERLE J. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). *Electric Resistance Measured on Vaginal Mucous Membrane in Pregnant and Non-Pregnant Sows*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) :415-420, 1971.

In 46 sows of which 31 were pregnant, the values of electric resistance measured on vaginal mucous membrane in oestrus (when mated or inseminated) were investigated after 21 and 42 days. In pregnant sows an average difference 41.1 resp. 39.5 ohms was ascertained among the values of the studied criterion measured in oestrus after 21 resp. 42 days, the difference was statistically highly significant ($P < 0.001$). In non-pregnant animals the average difference of the studied criterion was — 1.0 ohm; it is statistically insignificant. The dynamics of electrophysiological vaginal values studied in sows in the course of the first two thirds of their pregnancy is characterized by the variable tendency without any decline to the levels ascertained in oestrus. There was confirmed the possibility of the utilization of value of the electric resistance measured on the mucous vaginal membrane as the new indirect objective criterion regarding the early diagnostics of the pregnancy in sows.

dynamics of electrophysiological vaginal value in the course of pregnancy; early diagnostics of the pregnancy in sows

PODANÝ J., MUZIKANT J., ČANDERLE J. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Der auf der Vaginalschleimhaut gravider und nicht-gravider Sauen gemessene elektrische Widerstand*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) :415-420, 1971.

Bei 46 Sauen, davon 31 graviden, wurden die Werte des auf der Vaginalschleimhaut während der Brunst (beim Zulassen oder bei der Besamung) und nach 21 bzw. 42 Tagen gemessenen elektrischen Widerstands verfolgt. Bei graviden Sauen wurden zwischen den Werten dieses Kriteriums, die während der Brunst und am 21. bzw. 42. Tag nachher ermittelt wurden, durchschnittliche Unterschiede von 41,1 bzw. 39,5 Ohm festgestellt, die statistisch hochsignifikant sind ($P < 0,001$). Der bei nicht-graviden Sauen ermittelte durchschnittliche Wert des verfolgten Kriteriums betrug 1,0 Ohm und war statistisch nicht signifikant. Die Dynamik der bei den Sauen im Verlauf der ersten zwei Drittel der Gravidität festgestellten elektrophysiologischen Vaginalwerte weist eine schwankende Tendenz auf, ohne daß es aber zu einer Abnahme derselben bis auf das Niveau der während der Brunst ermittelten Werte kam. Es wurde die Möglichkeit einer Ausnutzung des auf der Vaginalschleimhaut gemessenen elektrischen Widerstands als neuen indirekten objektiven Kriteriums bei der praktischen Frühdiagnose der Gravidität von Sauen nachgewiesen.

Dynamik des elektrophysiologischen Vaginalwertes im Verlauf der Gravidität; Frühdiagnostik der Gravidität bei Sauen

Adresa autorů:

MVDr. J. Podaný, CSc., ing. RNDr. J. Muzikant, MVDr. J. Čanderle,
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

SEZÓNÍ DYNAMIKA A EPIZOOTOLOGIE NEMATODÓZ ČERNÉ ZVĚŘE (*SUS SCROFA* L.) V OBOŘE KVĚTOV

J. Páv, D. Zajíček

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Zbraslav n. Vlt.
Parazitologický ústav ČSAV, Praha

Věnováno k 60. narozeninám prof. MVDr. V. Dyka, DrSc.

PÁV J., ZAJÍČEK D. Sezónní dynamika a epizootologie nematodóz černé zvěře (*Sus scrofa* L.) v oboře Květov. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 421-430, 1971.

V oboře Květov, kde je celoročně chována a přikrmována černá zvěř (*Sus scrofa* L.), byli zjišťováni nematodi druhu *Ascarops strongylina* (Rud.), *Physoccephalus sexalatus* (Molin), *Ascaris suum* (Goeze), *Globocephalus urosubulatus* (Aless.), *Capillaria* sp., *Trichocephalus suis* (Schrunk), *Metastrongylus elongatus* (Dujard.), *Metastrongylus pudendotectus* (Wostokov). Pravidelným koprologickým sledováním zvířat byla během roku zjištěna dynamika vylučování vajíček jednotlivých druhů nematodů. Společným epizootologickým rysem sledovaných nematodů jsou dvou až třívrcholové křivky maximálního vylučování vajíček s maximy v zimě a v pozdním létě. Vylučování vajíček u některých geohelmintů v zimě ustává (*Ascaris*, *Trichocephalus*), u biohelmintů klesá, ale přetrvává po celé období. Epizootologie nematodóz je vázána na klimatické podmínky v oboře, na starší zvěř jako šířitele a na veterinárně hygienická opatření na krmelištích.

plicní, žaludeční a střevní nematodózy; dynamika vylučování vajíček; prevence

Epizootologie některých helmintóz domácích prasat je propracována v intenzivních i extenzivních chovech (Hobmaier 1925; Alicata 1935; Kriovošta 1939; Gildenblat 1939; Šmytova 1963; Mozgovoj 1967). U černé zvěře (*Sus scrofa* L.) mimo druhového zjištění helmintů (Jurášek 1956, 1959; Kotrlý 1958; Páv, Kotrlý, Zajíček 1961, 1962, 1963) se dosud nálezy epizootologicky nehodnotily. Měli jsme možnost zabývat se epizootologickou situací v oboře Květov, kde je černá zvěř celoročně přikrmována.

MATERIÁL A METODY

V oboře Květov se černá zvěř soustřeďuje na třech krmelištích v počtu kolem 220 kusů. Ke každému krmelci dochází kolem 60–70 zvířat různého stáří a pohlaví. U každého krmeliště se odebíralo v pravidelných měsíčních intervalech po dobu 13 měsíců 15 vzorků čerstvého trusu ke koprologickému vyšetření. Používali jsme flotační metody (Brez a 1959b) s kvantitativním vyhodnocením nálezů pomocí počítačové komůrky podle McMastera a v přepočtu na 1 g trusu (E. P. G.). Nálezy vajíček u starší zvěře se hodnotily odděleně od nálezů u selat. Průměr těchto hodnot se stal směrodatným ukazatelem pro výskyt a dynamiku nematodóz v oboře.

Před započítáním sledování byla provedena helmintologická pitva zaživacího traktu 67 střelených divokých prasat a stanoven helmintologický status.

VÝSLEDKY

Výchozí nálezy nematodů z počátku vyšetřování v roce 1969 jsou uvedeny v tabulce I, kde je současně zhodnocena intenzita i extenzita invazí v různých váhových a věkových kategoriích. Vycházejí z těchto sekčních nálezů sledovali jsme dynamiku výdeje vajíček jednotlivých druhů nematodů pomocí koprologického vyšetření po dobu 13 měsíců počínaje říjnem 1969 a konče říjnem 1970.

GEOHELMINTÉ

Ascaris suum Goetze, 1782

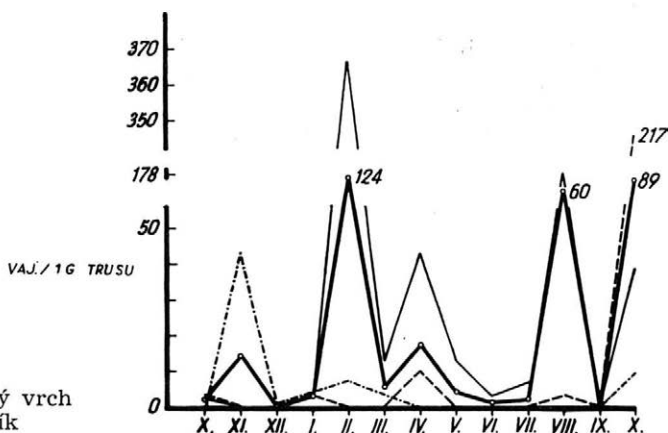
Vajíčka škrkavek se vyskytovala většinou u starších zvířat. Podle koprologických vyšetření se objevila dvě maxima výdeje vajíček, a to v únoru a v srpnu, s následným poklesem v září a opětovým vzestupem v říjnu. Během ostatních měsíců byl výdej vajíček rozkolísaný a nepřesáhl výskyt 45 kusů v 1 g trusu. Nejčastější nálezy se vyskytly u zvířat navštěvujících krmeliště Bukový vrch, kde jsme získali kompaktní křivku nálezů přerušenu pouze v listo-

I. Přehled zjištěných cizopasníků u černé zvěře v oboře Květov

Druh cizopasníka	Selata		Lonšáci		Starší		Celkem
	počet kusů	% napadení	počet kusů	% napadení	počet kusů	% napadení	% napadení
<i>Protozoa</i>							
<i>Eimeria deblickei</i>	15	60	18	57,5	3	33,3	53,7
<i>Eimeria perminuta</i>	7	28	8	24,2	2	22,2	25,3
<i>Nematoda</i>							
<i>Metastrongylus elongatus</i>	25	100	33	100,0	9	100,0	100,0
<i>Metastrongylus pudendotectus</i>	7	28	5	15,4	2	22,0	20,9
<i>Globocephalus urosubulatus</i>	23	92	19	53,0	4	44,0	68,5
<i>Oesophagostomum dentatum</i>	3	12	2	6,0	1	11,0	8,8
<i>Ascaris suum</i>	3	12	4	12,1	—	—	10,4
<i>Ascarops strongylina</i>	17	68	13	39,3	4	44,0	50,7
<i>Physocephalus sexalatus</i>	16	64	24	72,7	5	55,0	67,1
<i>Trichocephalus suis</i>	10	40	8	24,2	2	22,0	29,7
<i>Capillaria</i> sp.	3	12	4	12,1	1	11,0	11,9
<i>Arthropoda</i>							
<i>Ixodes ricinus</i>	7	28	4	12,1	2	22,0	19,3
<i>Haematopinus suis</i>	5	20	1	3,03	1	11,0	10,4
Celkem vyšetřeno kusů	25		33		9		67

1. Sezónní dynamika vylučování vajíček *Ascaris suum* v období X. 1960 až X. 1970 na základě koprologického vyšetřování

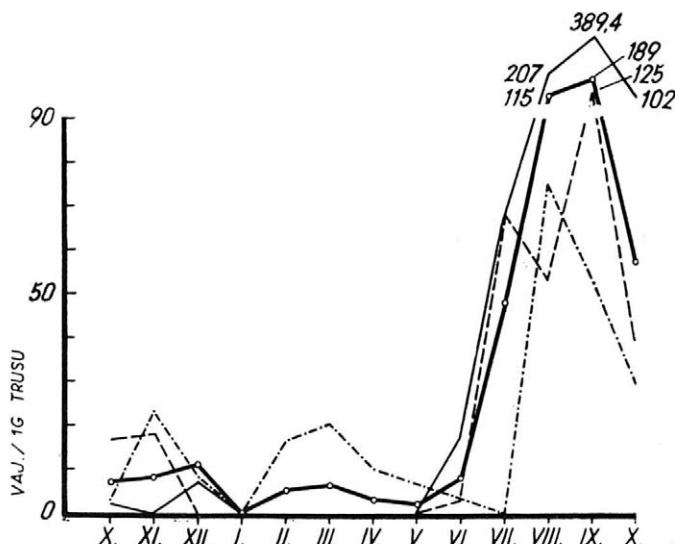
— průměr hodnot
 — krmeliště Bukový vrch
 - - - krmeliště Kostelík
 - · - · krmeliště Stehlovská kolna



padu a v prosinci negativními nálezy (obr. 1). U obou zbývajících krmelců jsme často zaznamenali negativní nálezy. Směrodatným ukazatelem celkové epizootologické situace se zdá být křivka průměrných nálezů u všech tří krmelců. U mladších zvířat, zejména u selat, která se hodnotila zvlášť, se vajíčka askarid vyskytovala sporadicky. Soudě podle pitev, není askaridóza v oboře příliš rozšířená, protože jsme ji zjišťovali ojediněle ve velice nízké intenzitě (maximálně čtyři exempláře u prasete).

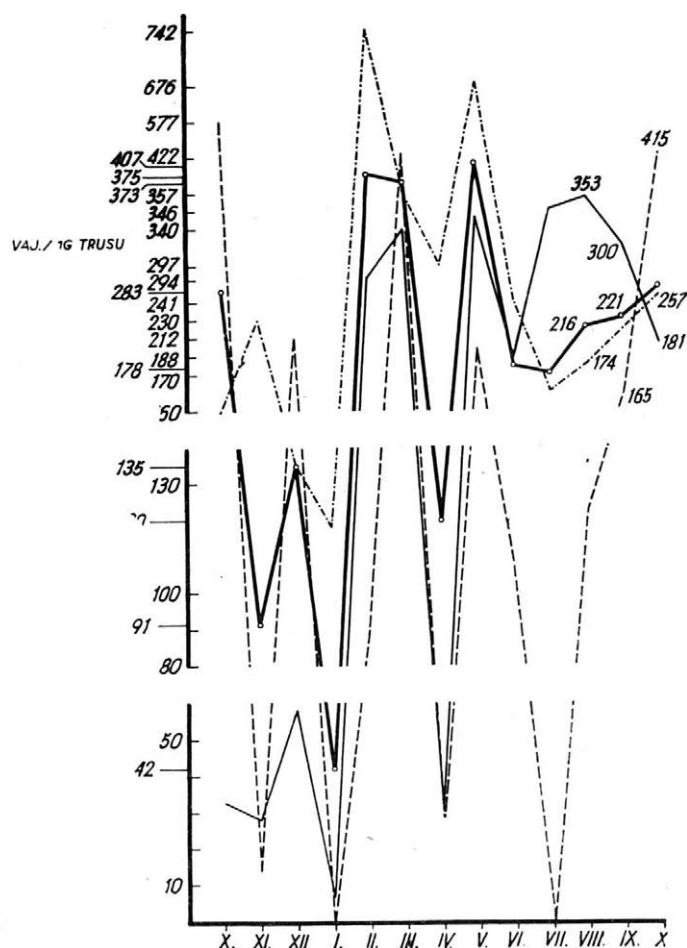
Trichocephalus suis Schrank, 1888

Výdej vajíček tenkohlavců se udržoval od října 1969 v poměrně vyrovnané hladině pouze s malým výkyvem v prosinci, po něm následoval pokles k nulovým hodnotám v lednu. Od května počal prudce stoupat, až v srpnu a září dosáhl maxima. Poměrně pravidelnou křivku poskytovalo vyšetření zvířat navštěvujících krmeliště Stehlovská kolna, zatímco na krmelištích Bukový



2. *Trichocephalus suis* (označení jako na obr. 1)

vrch a Kostelík byly nálezy od ledna do května negativní. Tento stav nálezů jsme zjišťovali jak u starých zvířat, tak i u mladších kusů a selat, v jejichž trusu se objevila vajíčka tenkohlavců až s nastupujícím létem. V prvních podzimních měsících nastal pozvolný pokles (obr. 2).



3. *Globocephalus urosubulatus* (označení jako na obr. 1)

Globocephalus urosubulatus Alessandrini, 1909

Výskyt vajíček tohoto nematoda v trusu zvířat všech věkových skupin byl poměrně vysoký. Celkový vývoj globocephalózy v oboře naznačuje křivka průměrných hodnot ze všech tří krmelišť (obr. 3). V počátku vyšetřování docházelo k pronikavému snížení výdeje vajíček, které přetrvávalo do ledna, kdy byly zjištěny nejnižší hodnoty. V únoru nastal prudký vzestup vylučování vajíček, který se ještě udržel v březnu a po něm následovalo opět snížení v dubnu. Mírný a krátkodobý vzestup v květnu vystřídal slabý pokles v červnu a červenci. Od srpna výdej vajíček opět stoupal až k hodnotám, které byly o málo vyšší než počáteční z předchozího roku. Lze tedy mluvit o třech vrcholech, a to zimním (únor až březen), jarním (květen) a podzimním (září až říjen).

Obraz výskytu vajíček u zvířat navštěvujících jednotlivá krmeliště byl souvislý a trvalý, vyjma krmeliště Kostelík, kde byl prokázán pokles k nulovým hodnotám v lednu a v červenci. U selat z vrhů v prvních měsících roku 1969 se neprokázaly kvantitativní odchylky od výdeje vajíček u starších zvířat po všechny sledované měsíce. U selat z vrhů z prvních měsíců roku 1970 se vajíčka začínala objevovat již od května a června. Selata se invadovala záhy po vymizení sněhové pokrývky, o čemž svědčí nález přes 1600 dospělců tohoto druhu u jednoho uhynulého selete.

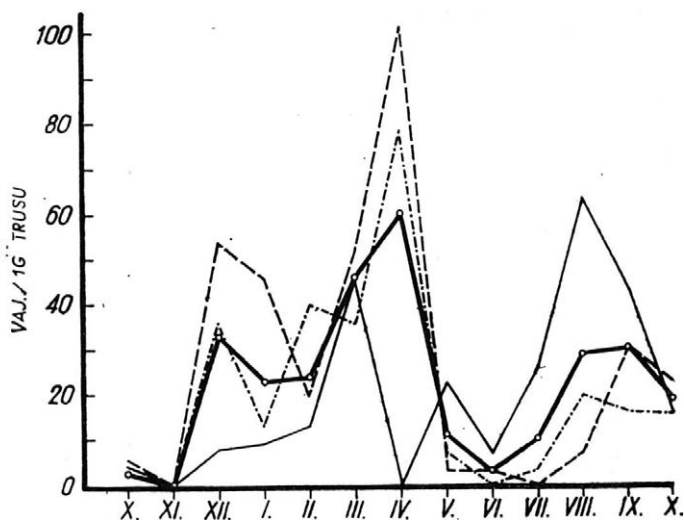
Capillaria spec.

Výskyt vajíček těchto nematodů se objevoval nepravidelně v trusu starších zvířat na všech třech krmelištích a vzhledem k tomu, že šlo o ojedinělé nálezy, nebylo je možné hodnotit ani v koprologických vyšetřeních, ani v helminologických pitvách.

BIOHELMINTÉ

Ascarops strongylina, Rudolphi, 1819

Vylučování vajíček tohoto druhu žaludečních nematodů bylo naprosto pravidelné u všech zvířat navštěvujících krmeliště. Celoroční průměrné hodnoty ze všech tří krmelišť, vyjádřené křivkou (obr. 4), udávají trojí zvýšení výdeje va-

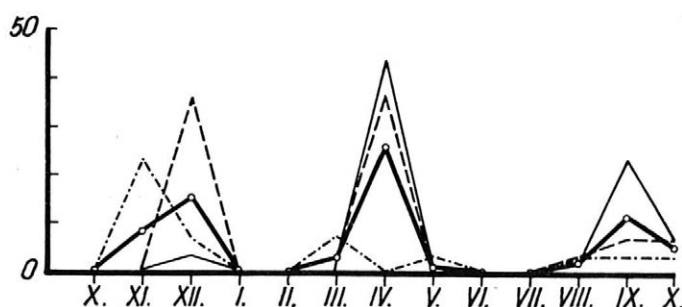


4. *Ascarops strongylina* (označení jako na obr. 1)

jíček, a to první v prosinci s mírným poklesem v lednu a únoru, druhé v dubnu s hlubokým poklesem až do června a třetí v srpnu a září. Tuto křivku průměrných hodnot nejvíce sledovala křivka nálezů vajíček u krmeliště Kostelík a Stehlovská kolna. U krmeliště Bukový vrch došlo k větším nepravidelnostem v nálezech, i když jsme zde zjistili silně invadované mezipřístroje, koprofágní brouky rodu *Geotrupes* a *Aphodius* larvami tohoto druhu nematodů. Zjištěné hodnoty odpovídaly především nálezům u starší zvěře. U selat z vrhů v témž roce (1969, 1970) nebyla ještě v letním období vajíčka zjišťována.

Physocephalus sexalatus, Molin, 1860

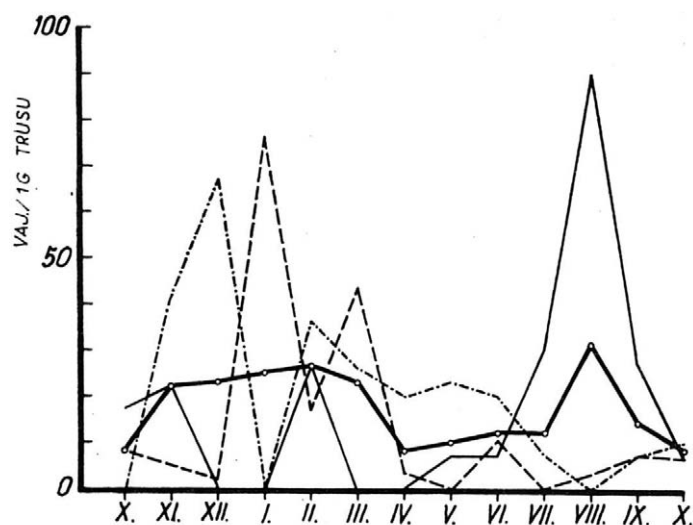
Hodnocení dynamiky vylučování vajíček tohoto druhu žaludečních nematodů bylo velice obtížné, neboť se s nepravidelnostmi vyskytovalo u všech krmelišť. Vajíčka byla zjišťována především v trusu starších zvířat, přičemž početnost v 1 g trusu nepřesáhla počet 50 (E. P. G.). V křivce zachycující průměr vyšetření od všech tří krmelišť (obr. 5) lze zjistit první maximální výdej vajíček v prosinci, po němž následovalo lednové a únorové přerušení; další maximum vylučování nastalo v dubnu. Po něm došlo k poklesu až vymizení vajíček do června a července a následovalo slabé zvýšení v srpnu a září s poklesem v říjnu. Rozkolísanost vylučování vajíček na jednotlivých krmelištích je možné vysvětlit malou početností vajíček v trusu zvířat vzhledem k nízké intenzitě invazí u pitvaných divokých prasat.



5. *Physocephalus sexalatus* (označení jako na obr. 1)

Metastrongylus spec.

Stabilní výdej vajíček tohoto druhu plícňívek se zjišťoval pouze u krmeliště Stehlovská kolna a Kostelík. U krmeliště Kostelík došlo k největšímu výdeji vajíček v zimních měsících a na jaře, s minimem v létě, podobně tomu bylo i na



6. *Metastrongylus spec.* (označení jako na obr. 1)

krmelišti Stehlovská kolna, kde po maximálním výskytu vajíček v prosinci docházelo k povlovnému vylučování vajíček od jarních měsíců k létu. Naopak na krmelišti Bukový vrch byl vrchol maximálního výdeje vajíček zaznamenán v letních měsících s poklesem v podzimních. Křivka průměrných hodnot (obr. 6) ukazuje dosti vysoký výdej vajíček v zimních měsících s poklesem v jarních a vzestupem v letních měsících. Porovnáme-li tuto křivku výdeje vajíček u všech krmelců, zjišťujeme, že výskyt vajíček v trusu byl poměrně trvalý. Je nutné však dodat, že zjišťované hodnoty byly získány vyšetřením trusu starších a starých zvířat, zatímco u mladších zvířat (zejména selat) byly nálezy méně časté.

DISKUSE

U uvedených nematodóz černé zvěře (*Sus scrofa* L.) se dosud nikdo nezabýval sezónní dynamikou výdeje vajíček vzhledem k epizootologii. V dynamice vylučování vajíček hrají závažnou úlohu celkové klimatické poměry v dané oblasti, protože ty ovlivňují vývoj invazních larev a vylučování vajíček invadovanými zvířaty naopak signalizuje probíhající invaze nebo zvýšenou ovulaci samic.

Vzhledem k epizootologickým poměrům v oboře je možné naše nálezy při askaridóze konfrontovat se zjištěním Krivošty (1939), který pozoroval, že vývoj vajíček škrkavek na pastvině neprobíhal od října do dubna, zatímco v ostatních měsících roku probíhal bez zábran. Invazní larva se vytvořila za 21 den při teplotě 18–24 °C. Nejkratší doba vývoje byla v letních měsících za 10 až 14 dnů. Podobná zjištění uvádí i Alicata (1935). Těmto nálezům odpovídají i křivky grafu, které naznačují probíhající invaze u zvířat.

Výskyt vajíček tenkohlavců v letním období souvisí s jejich větší náročností na teplotní podmínky při vývoji larev; Alicata (1935) a Mozgovoj (1967) uvádějí, že vývoj invazních larev proběhne za 28 až 33 dny při teplotě 28–30 °C. Tito autoři také zjistili, že v trusu prasat se larvy vyvíjejí pomaleji a v hniјícím prostředí vývoj vůbec neprobíhá. Podle pozorování Ščerbina (1949) se v letních měsících larvy formovaly ve stínu během 35 dnů, v místech polozatemnělých se vyvinuly za 29 dnů, zatímco na místech vystavených slunci hynuly za týden. Těmto zjištěním odpovídají i výsledky našeho sledování vývoje vajíček, kdy se jejich maximum objevovalo v trusu zvířat v nejteplejším období.

U *Globocephalus urosubulatus* se naše pozorování shodují s údaji Gildenblatové (1939), která zjistila, že vajíčka se objevují v trusu zvířat 22. den po invazi. Největší invaze u prasat na pastvě zjistila v březnu, jarní pokles v květnu a od června mírný vzestup přes podzimní měsíce s kulminací v lednu. Zdá se, že dynamika výdeje vajíček u domácích prasat je více ovlivněna ustájením, zatímco u divokých prasat podle našich pozorování se více přizpůsobuje klimatickým podmínkám ročních období.

Vývoj larválních stádií a dynamiku invazí *Ascarops strongylina* u domácích prasat sledovala Šmytova (1961, 1962) a uvádí, že v SSSR maximum invazí u pasených prasat se objevuje v srpnu a minimum v březnu. U ročních prasat se maximální invaze vyskytují v srpnu až říjnu a snižují se během zimních měsíců. Podle našich koprologických vyšetření probíhala invadovanost v oboře Květov poněkud odlišně u starších zvířat, jenom u selat odpovídala zjištěním autorky.

U nematodů *Physocephalus sexalatus* nebyla dosud hodnocena ani dynamika invazí, ani vylučování vajíček. U obou druhů je invaze závislá na výskytu larev u koprofágních brouků, kteří jsou mezihostiteli (Zajíček, Páv, v tisku).

Plícnivky *Metastrongylus elongatus* a *M. pudendotectus* potřebují ke svému larválnímu vývoji dešťovky jako mezihostitele (Breza 1959a). V nich se podle Alicata (1935) vyvinou invazní larvy za 25 až 35 dnů, Tiunov (1960) uvádí optimální dobu vývoje 40 až 45 dní, nejdelší do 60 dnů. Přihlédneme-li ke zjištěním obou autorů, může k invazím docházet v celém teplejším období roku, kdy se dešťovky zdržují blízko pod povrchem půdy. Přesto však je obtížné vysvětlení pro výdej vajíček v zimním období. Obdobný výdej larev plícnivek čeledi *Protostrongylidae* jsme pozorovali v zimním období u jelenovitých (Páv, Zajíček 1969).

Ve všech případech sledovaných nematodóz v oboře jsme jako hlavní zdroj invazí zjistili mnohaletá, hygienicky zanedbaná krmeliště, kde se zvířata pravidelně scusťedují a kde zárodky se mohou nejen vyvíjet, ale i přezívat a s roztroušeným krmením znovu invadovat zvěř.

Literatura

- ALICATA J. E., 1935, Early developmental studies of nematodes occurring in swine. U. S. Dept. Agric. Techn. Bull. N. 489 : 1-96.
- BREZA M., 1959a, K epizootologii metastrongylózy prasat. Vet. čas. 8 : 94-99.
- BREZA M., 1959b, Zlepšenie metodiky koproovoskopického vyšetrovania trusu ošípaných s použitím nového flotačného roztoku a mukogelu. Vet. čas. 8 : 569-576.
- GILDENBLAT A. A., 1939, Globocefalez svinej. Kand. Diss. Moskva.
- HOBMAIER M., 1925, Die Entwicklungsgeschichte und die pathologische Bedeutung von *Physocephalus sexalatus* (*Spiroptera sexalata* Molin). Münch. Tierärztl. Wschft. 76 : 361-366.
- JURÁŠEK V., 1956, K faune parazitických červů divého prasata na Slovensku. Helminthologia : 287-291.
- JURÁŠEK V., 1959, K faune parazitických červů diviaka na Slovensku II. Folia Vet. Fac. Med. Cassoviensis III : 267-281.
- KOTRLÝ A., 1958, Plícní helmintofauna spárkaté zvěře v ČSR. Čs. paras. V : 101-110.
- KRIVOŠTA E. E., 1939, Epizootologia i profilaktika pri askaridoze svinej. Tr. Rostovsk. Obl. Vet. Opytnoj Stancii 7 : 86-94.
- MOZGOVOJ A. A., 1967, Gelminty domašnich i dikich svinej i vyzyvaemye imi zabolevania. Moskva.
- PÁV J., KOTRLÝ A., ZAJÍČEK D., 1961, Cizopasní červi černé zvěře (*Sus scrofa* L.) některých oblastí v Čechách a na Moravě. I. Vet. Med. (Praha) 4 : 287-300.
- PÁV J., KOTRLÝ A., ZAJÍČEK D., 1962, Cizopasní červi černé zvěře (*Sus scrofa* L.) některých oblastí v Čechách a na Moravě. II. Vet. Med. (Praha) 3 : 185-192.
- PÁV J., KOTRLÝ A., ZAJÍČEK D., 1963, Příspěvek k helmintofauně černé zvěře (*Sus scrofa* L.) v oborách a ve volnosti. Les. čas. (Praha) 9 : 251-260.
- PÁV J., ZAJÍČEK D., 1969, Helmintofauna jelení zvěře a dynamika jejího výskytu v oboře Janovice. Lesnictví 14 : 133-146.
- ŠČERBININ I. V., 1949, K izučení biologii svinogo vlasoglava *Trichocephalus suis* (Schrank, 1788) i metodov ego devastacii. Kand. Diss. Odessk SCHI.
- ŠMYTOVA G. J., 1961, Razvitie *Ascarops strongylina* (Rud.) v organizme promezutočného chozjajina. Tr. GELAN 11 : 363-372.
- ŠMYTOVA G. J., 1962, O značení žukův-koprofagů v epizootologii nekotorych spiruratozov domašnich životnyh. Tr. GELAN 12 : 331-344.

- ŠMYTOVA G. J., 1963, *Biologia Ascarops strongylina* (Rudolphi, 1819) i voprosy epizootologii askaropsoza svinej. Kand. Diss. VIGIS, Moskva.
- TIUNOV V. I., 1960, Opyt likvidacii metastrongyleza svinej v chozjajstve. Tezisy dokl. VOG, I, II, Moskva.
- ZAJÍČEK D., PÁV J., 1971, Mezihostitelé *Ascarops strongylina* (Rud.) a *Physocephalus sexalatus* (Molin) (Nematoda) v oboře Květov. Folia Parasit. (Praha) (v tisku).

Došlo dne 20. 1. 1971

ПАВ И., ЗАЙЧЕК Д. (Научно-исследовательский институт лесного и охотничьего хозяйства, Збраслав-н-Влт.; Паразитологический институт ЧСАН, Прага, Чехословакия). Сезонная динамика и эпизоотология нематодозов диких кабанов (*Sus scrofa* L.) в заповеднике Кветов. Вет. Мед. (Прага) 16 (7) : 421-430, 1971.

В заповеднике Кветов, где круглый год разводят и прикармливают диких кабанов (*Sus scrofa* L.), определяли нематоды видов *Ascarops strongylina* (Rud.) *Physocephalus sexalatus* (Molin), *Ascaris suum* (Goeze), *Globocephalus urosubulatus* (Aless.), *Capillaria* sp., *Trichocephalus suis* (Schränk), *Metastrongylus elongatus* (Dujard.), *Metastrongylus pudendotectus* (Wostokov). Путем систематического копрологического наблюдения за животными в течение года определили динамику выделения яиц отдельными видами нематод. Общей эпизоотологической чертой изучаемых нематодозов являются 2—3-верхушечные кривые максимального выделения яиц с максимумами зимой и поздним летом. У некоторых геогельминтов (*Ascaris*, *Trichocephalus*) выделение яиц прекращается, у биогельминтов понижается, но сохраняется в течение всего периода. Эпизоотология нематодозов зависит от климатических условий заповедника, от старой дичи как распространителя болезни и от ветеринарно-санитарных мер в кормушках.

легочные, желудочные и кишечные нематодозы; динамика выделения яиц; профилактика

PÁV J., ZAJÍČEK D. (Research Institute of Forestry and Hunting, Zbraslav n. Vlt., Institute of Parasitology of the Czechoslovak Academy of Sciences, Praha, Czechoslovakia). Season Dynamics and Epizootology of Wild Boars (*Sus scrofa* L.) Nematodoses in the Preserve of Květov. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 421-430, 1971.

In the preserve of Květov, where wild boars (*Sus scrofa* L.) are kept and given supplementary food all the year round nematodes of the following species: *Ascarops strongylina* (Rud.), *Physocephalus sexalatus* (Molin), *Ascaris suum* (Goeze), *Globocephalus urosubulatus* (Aless.) *Capillaria* sp. *Trichocephalus suis* (Schränk). *Metastrongylus elongatus* (Dujard.), *Metastrongylus pudendotectus* (Wostokov) were determined. By means of a regular coprological observation of the animals the dynamics of egg excretion of each kind of nematodes was determined during the year. Two to three-peak curves of maximum egg secretion with maxima in winter and late summer are a common epizootological trait of the observed nematodoses. Egg excretion ceases in winter in some geohelminths (*Ascaris*, *Trichocephalus*), it decreases but lasts for the whole period in biohelminths. The epizootology of nematodoses depends on the climatic conditions in the preserve, on older game spreading them and on the veterinary and hygienical measures at feeding places.

lung, stomach and gut nematodoses; dynamics of egg excretion; prevention

PÁV J., ZAJÍČEK D. (Forschungsinstitut für Forstwirtschaft und Jagdwesen, Zbraslav n. Vlt., Institut für Parasitologie der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha, Tschechoslowakei). Saisondynamik und Epizootologie der Nematodosen des Schwarzwildes (*Sus scrofa* L.) im Gehege Květov. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 421-430, 1971.

Im Gehege Květov, wo Schwarzwild (*Sus scrofa* L.) das ganze Jahr gehalten und zusätzlich gefüttert wird, sind Nematoden der Arten *Ascarops strongylina* (Rud.), *Physocephalus sexalatus* (Molin), *Ascaris suum* (Goeze), *Globocephalus urosubulatus* (Aless.), *Capillaria* sp., *Trichocephalus suis* (Schränk), *Metastrongylus elongatus*

(Dujard.) *Metastrongylus pudendotectus* (Wostokov) ermittelt worden. Durch eine regelmäßige koprologische Verfolgung der Tiere wurde im Laufe des Jahres die Dynamik des Eierausscheidens der einzelnen Nematodenarten ermittelt. Zwei- bis Dreischeitelkurven der maximalen Eierausscheidung mit Maxima im Winter und Spätsommer sind ein gemeinsamer epizootologischer Zug der verfolgten Nematodosen. Im Winter hört die Eierausscheidung bei einigen Geohelminthen (*Ascaris*, *Trichocephalus*) auf, bei Biohelminthen wird sie herabgesetzt, jedoch dauert für die ganze Periode. Die Nematodosenepizootologie ist auf die klimatischen Bedingungen im Gehege, auf das ältere Wild als Verbreiter und auf die veterinär-hygienischen Maßnahmen auf Futterplätzen gebunden.

Lungen-, Magen- und Darmnematodosen; Dynamik der Eierausscheidung; Prävention

PÁV J., ZAJÍČEK D. (Institut de recherches pour la sylviculture et la cynégétique, Zbraslav sur la Vltava, Institut de parasitologie de l'Académie tchécoslovaque des sciences, Prague, Tchécoslovaquie). *Dynamique saisonnière et épizootologie des nématodoses des bêtes noires (Sus scrofa L.) dans le parc à gibier Květov*. Vet. Med. (Prague) 16 (7) : 421-430, 1971.

Dans le parc à gibier Květov, où l'on élève et effectue la distribution supplémentaire des aliments aux bêtes noires (*Sus scrofa* L.), on identifiait les nématodes des genres *Ascarops strongilina* (Rud.), *Physocephalus sexalatus* (Molin), *Ascaris suum* (Goeze), *Globocephalus urosubulatus* (Aless.), *Capillaria* sp., *Trichocephalus suis* (Schrank), *Metastrongylus elongatus* (Dujard.), *Metastrongylus pudendotectus* (Wostokov.). En effectuant régulièrement les analyses des matières fécales des animaux, on a pu identifier au cours de l'année la dynamique de sécrétion des oeufs des espèces particulières de nématodes. Ce sont les courbes à deux ou trois sommets de sécrétion des oeufs, accusant les maxima en hiver et en été tardif qui constituent le caractère épizootologique commun des nématodoses suivies. La sécrétion des oeufs s'arrête en hiver chez certains géohelminthes (*Ascaris*, *Trichocephalus*), diminuant chez les biohelminthes, mais ne s'arrête pas pendant toute la période. L'épizootologie des nématodoses est liée aux conditions climatiques dans le parc à gibier, au gibier plus âgé en tant que transmetteur, et aux mesures hygiéniques et vétérinaires aux places de fourrage.

nématodoses pulmonaires, stomacales et intestinales; dynamique de la sécrétion des oeufs; prémunition

Adresy autorů:

MVDr. J. P á v, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Zbraslav n. Vlt.,
MVDr. D. Z a j í č e k, CSc., Parazitologický ústav ČSAV, Praha 6, Flemingovo n. 2

EXPERIMENTÁLNÍ INVAZE PLICNIVKAMI DICTYOCAULUS VIVIPARUS U MORČAT PO PARENTERÁLNÍ APLIKACI LAREV

J. Tománek

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

TOMÁNEK J. *Experimentální invaze plicnivkami Dictyocaulus viviparus u morčat po parenterální aplikaci larev.* Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 431-437, 1971.

Bylo prokázáno, že po s.c., i.m. a i.p aplikaci invazních larev *Dictyocaulus viviparus* dochází k invazi do plic morčat a zjištěné počty larev za tři dny po aplikaci se podstatně neliší od počtu larev zjištěných po invazi per os. Vývoj larev ozářených 20 kR aplikovaných s.c. morčatům probíhal stejným způsobem, jako u larev ozářených stejnou expozicí, které byly aplikovány per os. U larev ozářených 40 kR byly zjištěny rozdíly 10. dne po invazi. U larev ozářených vysokými expozicemi 80–120 kR bylo zjištěno, že po perorální invazi migrují do plic morčat ve větším počtu než larvy aplikované s.c. Zjištěné poznatky slouží jako podklad pro další pokusy s imunizací zvířat larvami aplikovanými parenterálně.

invazní larvy; ionizující záření; plíce; migrace

Obvyklá cesta invaze plicnivkami z rodu *Dictyocaulus* u přirozených hostitelů je per os při pasení zvířat na zamořené pastvině nebo při pití vody z nehygienických napajedel, do kterých byly spláchnuty invazní larvy. Doposud komerčně vyráběné vakcíny proti diktyokaulóze skotu a ovcí, obsahující invazní larvy oslabené ionizujícím zářením, jsou rovněž aplikovány ve formě suspenze per os.

O parenterální aplikaci larev plicnivek se pokusilo s různým cílem zaměřením několik autorů. Úspěšnou invazi po subkutánní injekci I. a III. stadia larev *Dictyocaulus viviparus* provedli u telat Wade a Swanson (1958). U zvířat došlo k typické verminózní pneumonii a k vylučování larev trusem. Cornwell (1962) úspěšně imunizoval telata i. p. aplikací IV. larválního stadia plicnivek *Dictyocaulus viviparus*, které byly získány z plic telat. U příbuzného druhu plicnivek *Dictyocaulus filaria* zjistili Davtjan a Šulc (1956) po intraperitoneální a intramuskulární aplikaci 35 000–150 000 invazních larev ovcím, že 0,01–0,03 % aplikovaných larev migrovalo do plic a dosáhlo dospělosti.

Protože pokusy s různou parenterální aplikací larev plicnivek u přirozených hostitelů by byly značně nákladné, uskutečnili jsme předběžná sledování na morčatech, která byla použita jako modelová zvířata při invazích larvami *Dictyocaulus viviparus* již dříve řadou autorů (Wade a kol. 1960, Poynter a kol. 1960, Tománek a Procházková 1965, Tománek 1968). Cílem této práce bylo zjistit, zda po různé parenterální aplikaci invazních larev *Dictyocaulus viviparus* dochází k invazi do plic morčat a srovnat stupeň vývoje larev neozářených a ozářených ionizujícím zářením.

MATERIÁL A METODY

Invazní larvy *Dictyocaulus viviparus* byly izolovány z trusu pokusně invadovaných telat. Zbytky detritu byly odstraněny opakovanou dekantací. Pak byly larvy třikrát promyty sterilním fyziologickým roztokem s přídavkem meriolátu 1: 10 000 s následnou centrifugací 5 minut při 1000 obr./min.

Larvy oslabené ionizujícím zářením byly ozářeny terapeutickým rentgenovým přístrojem TUR 250 při 180 kV, 15 mA, filtraci 2,5 mm Al, OK = 21 cm a přílivu 800 R/min.

Larvy byly aplikovány morčatům o váze 250–300 g v dávce 5000, 10 000 nebo 20 000 kusů v 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku subkutánně na hřbetě, intramuskulárně do stehenního svalstva pravé končetiny a intraperitoneálně běžnou metodou. Dále byly udělány pokusy s invazí larev *per cutim*. Morčeti byla oholena srst na břichu a zadních končetinách a zvíře bylo posazeno po dobu 60 minut do menší nádoby s malým množstvím vody, ve které byl větší počet invazních larev plicnívek. Při opakování pokusu s invazí *per cutim* byla tekutina obsahující invazní larvy kapána na oholenou kůži hřbetu; zvířeti bylo zabráněno olízat si mokrou srst obsahující larvy. V obou případech byla srst holena holicím strojkem se žiletkou, takže došlo k drobným pcraněním pokožky.

Zvířata byla utrácena za tři, příp. za šest a deset dnů po aplikaci larev. Po makroskopickém posouzení byly plíce tupě roztrhány na drobné kousky pomocí pinzet a macerovány ve fyziologickém roztoku přes noc v termostatu při teplotě asi 35 °C. Roztok byl potom přecezen přes sítko a odstředován 3–5 minut při 1000 obr./min. Získaný sediment byl rozetřen v tenké vrstvě na podložní skličko a prohlížen při malém zvětšení mikroskopem. Ve všech případech byl zpracován celý sediment. Stadium vývinu larev bylo stanoveno podle dříve publikované práce (T o m á n e k 1968).

VÝSLEDKY

Naše pokusy prokázaly, že invazní larvy *Dictyocaulus viviparus*, aplikované různými parenterálními způsoby, migrují do plic. Počet larev zjištěných v plicích morčat za tři dny po invazi se signifikantně neliší od počtu larev zjištěných po invazi *per os* při použití stejného počtu larev ze stejné šarže. Výsledky jsou patrné z přehledné tabulky I. Stupeň vývoje larev byl ve všech případech stejný a odpovídal III. svlečenému larválnímu stadiu.

Jelikož *s. c.* injekce larvální suspenze představuje pro případné praktické použití při vakcinaci nejvhodnější způsob aplikace, věnovali jsme v dalších pokusech se *s. c.* aplikací pozornost také larvám oslabeným ionizujícím zářením. Larvy oslabené expozicí 40 kR ionizujícího záření aplikované *s. c.* byly zjišťovány za tři dny po invazi v plicích v přibližně stejném počtu jako larvy aplikované *per os*. Počty zjištěných larev se rovněž nelišily od výsledků získaných jak po *s. c.*, tak po perorální aplikaci stejného počtu neozářených invazních larev.

Další pokusy se *s. c.* aplikací larev oslabených vyššími expozicemi ionizujícího záření (80, 100 a 120 kR) jsou patrné v tabulce II. Se stoupající celkovou expozicí klesal počet zjištěných larev, které migrovaly do plic. Vyšetřením podkoží v místě injekce bylo zjištěno, že část larev zde setrvává i za tři dny po aplikaci. Larvy ozářené 120 kR byly z větší části mrtvé, pouze malá část byla pohyblivá; tyto larvy byly převážně svlečené. Z larev ozářených 80

I. Počet zjištěných larev v plicích morčat po různé aplikaci invazních larev *Dictyocaulus viviparus*

Způsob aplikace	Počet aplikovaných larev	Expozice	Počet larev v plicích za tři dny po invazi
<i>s. c.</i>	20 000	neozář.	353, 423
<i>per os</i>	20 000	neozář.	375, 460
<i>s. c.</i>	20 000	ozář. 40 kR	362, 367
<i>per os</i>	20 000	ozář. 40 kR	360, 372
<i>per os</i>	5 000	neozář.	70, 108
<i>s. c.</i>	5 000	neozář.	72, 74
<i>i. m.</i>	5 000	neozář.	48, 72
<i>i. p.</i>	5 000	neozář.	78, 122
<i>per cutim</i> (oholené břicho)	v nádobě 10 000 larev	neozář.	45
<i>per cutim</i> (oholený hřbet)	na kůži nakapáno 5 000 larev	neozář.	0, 0

II. Počty larev v plicích morčat po *s. c.* a perorální aplikaci 10 000 invazních larev *Dictyocaulus viviparus* ozářených expozicemi 80–120 kR paprsky X

Způsob aplikace	Expozice	Počet larev v plicích za tři dny po invazi
<i>s. c.</i>	120 kR	8, 10
	100 kR	37, 46
	80 kR	49, 76
	neozář.	418, 605
<i>per os</i>	120 kR	94, 101
	100 kR	251, 364
	80 kR	160, 326
	neozář.	515, 1003

a 100 kR byla průměrně polovina živých. Larvy neozářené, zjištěné v podkoží, byly převážně živé a svlečené. Ze srovnání počtu zjištěných larev v plicích morčat po *s. c.* a perorální aplikaci je patrné, že larvy oslabené vyššími expozicemi (80–120 kR) migrují do plic po *s. c.* aplikaci v menším počtu než larvy aplikované *per os*. U larev neozářených (tabulka I a II) byly v plicích morčat zjišťovány po *s. c.* a perorální aplikaci přibližně stejné počty.

V dalším pokusu jsme sledovali, jak dlouho zůstávají larvy v plicích a stupeň vývoje larev oslabených expozicí 20 kR po *s. c.* aplikaci ve srovnání se stejně oslabenými larvami podanými *per os* a neozářenými larvami aplikova-

III. Počty larev získaných z plíc morčat za 3, 6 a 10 dnů po s. c. a perorální aplikaci invazních larev *Dictyocaulus viviparus*

Expozice, aplikace*)	3. den	6. den				10. den				
	III. svl.	III—IV	IV	IV—V	celkem	III—IV	IV	V		celkem
								♀	♂	
20 kR s. c.	57	25	14	0	39	0	0	0	0	0
	36	10	13	0	23	1	7	2	0	10
	4	10	15	4	29	2	2	11	0	15
	97	45	42	4	91	3	9	13	0	25
	Ø 32,3				Ø 30,3					Ø 8,3
40 kR s. c.	128	1	12	0	13	0	7	0	0	7
	97	12	90	3	105	0	20	1	0	21
	14	3	38	8	49	0	23	0	0	23
	239	16	140	11	167	0	50	1	0	51
	Ø 79,7				Ø 55,7					Ø 17
20 kR per os	101	9	27	0	36	0	15	22	0	37
	140	35	72	13	120	0	6	11	0	17
	21	0	4	1	5	0	7	4	0	11
	262	44	103	14	161	0	28	37	0	65
	Ø 87,3				Ø 53,7					Ø 21,7
neozář. s. c.	42	20	26	21	67	0	11	44	74	129
	26	24	49	11	84	0	0	19	10	29
	15	10	5	12	27		nehodnoceno			
	83	54	80	44	178	0	11	63	84	158
	Ø 27,7				Ø 59,3					Ø 79

*) — každému morčeti bylo aplikováno 5000 larev

nými s. c. V každé skupině bylo devět morčat, z nichž byly v určené době tři kusy z každé skupiny utraceny. Výsledky získané za 3, 6 a 10 dní po invazi jsou patrné z tabulky III. Třetí den po invazi byly u všech skupin zjištěny v plicích morčat larvy odpovídající III. svlečenému larválnímu stadiu. U skupin morčat, kterým byly aplikovány s. c. larvy neozářené a ozářené 20 kR, byl zjištěn v průměru přibližně stejný počet larev. U zvířat invadovaných *per os* larvami ozářenými 20 kR a s. c. 40 kR byl zjištěn více než dvojnásobný počet larev. Šestý den po invazi se průměrně zjištěné počty larev u všech skupin výrazně nelišily, i když u morčat invadovaných s. c. larvami ozářenými 20 kR byl zjištěn nejnižší průměrný počet. Určité rozdíly se však začaly objevovat ve vývojovém stadiu larev mezi IV. až V. stadiem. U zvířat invadovaných s. c. neozářenými larvami byl počet těchto larev výrazně vyšší. Největší rozdíly v celkovém počtu průměrně zjištěných larev a v jejich vývojovém stadiu byly zjištěny 10. den po invazi. Nejvyšší počet byl zjištěn u morčat invadovaných s. c. neozářenými larvami, nejnižší u zvířat invadovaných s. c. larvami ozářenými 20 kR. U této skupiny byly zjištěny ještě 10. den ojedinělé larvy odpovídající vývoji mezi III. až IV. stadiem. U skupin, u kterých byly aplikovány larvy ozářené 20 a 40 kR, nebyli zjištěni u V. larválního stadia žádní samečci.

DISKUSE

Naše pokusy prokázaly, že po s. c., i. p. a i. m. aplikaci invazních larev docházelo k invazi plic u morčat a počty larev zjištěné za tři dny po invazi se podstatně nelišily od počtu larev zjištěných po invazi *per os*. Tím jsme si zároveň ověřili některé údaje, které publikovali o paranterální aplikaci plicnívek u ovcí Davtjan a Šulc (1956), a u skotu Wade a Swanson (1958). Domněnku, že k invazím může docházet u skotu v přirozených podmínkách poraněnou pokožkou, kterou vyslovili Wade a Swanson (1958), se nám nepodařilo jednoznačně prokázat. Zatímco u morčete, kterému byla oholena srst na břiše a bylo posazeno na dobu 60 minut do vody obsahující invazní larvy, byla po třech dnech zjištěna invaze larev v plicích, v dalším pokusu, při kterém byla suspenze larev kapána a vtírána jemnou masáží skleněným kapátkem na oholenou kůži hřbetu po dobu 60 minut, jsme invazi larev v plicích morčat nezjistili. V obou případech došlo při holení k drobným poraněním pokožky. Domníváme se, že v prvním případě není vyloučena i současná invaze *per os*, neboť morče si mohlo olízat mokrou pokožku a okolní srst. Při aplikaci larev na oholenou kůži hřbetu byla tato možnost vyloučena.

Vývoj larev ozářených 20 kR, které byly aplikovány s. c. morčatům, probíhal v podstatě stejným způsobem jako u larev ozářených stejnou expozicí, kterými byla invadována morčata *per os* v našich dřívějších pokusech (Tománek, Procházka 1965). U larev ozářených 40 kR, aplikovaných s. c., byly zjištěny 10. den po invazi larvy IV. larválního stadia, zatímco po perorální aplikaci larev ozářených stejnou expozicí žádné larvy zjišťovány nebyly. Tento rozdíl byl patrně způsoben tím, že část larev aplikovaných s. c. migrovala do plic opožděně, takže ještě nedošlo k jejich vypuzení mezi IV. a V. larválním stadiem, jak uvádějí Poynter a Terry (1962) po invazi *per os* u larev *Dictyocaulus viviparus* oslabených expozicí 40 kR a jak jsme zjistili v našich pokusech na morčatech (Tománek, Procházka 1965).

Při s. c. aplikaci larev ozářených vysokými expozicemi 80–120 kR mor-

čatům nám nevyšel náš původní záměr oslabit larvy natolik, aby zůstaly živé v podkoží a nemigrovaly do plic. Prokázali jsme však, že larvy oslabené vysokými expozicemi ionizujícího záření migrují po perorální invazi ve větším počtu do plic morčat než stejně oslabené larvy aplikované s. c.

Zjištěné poznatky o invazi larev do plic morčat po parenterální aplikaci budou využity při imunizaci zvířat larvami oslabenými ionizujícím zářením.

Literatura

- CORNWELL R. L., 1962, Production of immunity to *Dictyocaulus viviparus* by the parenteral administration of fourth stage larvae. J. comp. Path. Ther. 72 : 181-189.
- DAVTJAN E. A., ŠULC R. S., 1956, Vvedení živých kultur ličinek dlja imunizacii k legočnym gelmintam. Izv. akad. nauk armjanskj SSR 9 : 67-73.
- POYNTER D., JONES B. V., NELSON A. M. R., PEACOCK R., ROBINSON J., SILVERMAN P. H., TERRY R. J., 1960, Recent experiences with vaccination. Vet. Rec. 72 : 1078-1090.
- POYNTER D., TERRY R., 1962, Progress towards the satisfactory standardization of an X-irradiated lungworm vaccine. Proc. 7th Int. Soc. Biol. Standardization, London, 7 : 520-525.
- TOMÁNEK J., 1968, Experimentelle Ansteckung von Meerschweinchen mit *Dictyocaulus viviparus*. Helminthologia 9 : 559-562.
- TOMÁNEK J., PROCHÁZKA Z., 1965, Provéření biologické účinnosti ionizujícího záření na invazní larvy *Dictyocaulus viviparus* na morčatech. Vet. Med. (Praha) 10 : 481-488.
- WADE A. E., SWANSON L. E., 1958, Lungworm infections in calves produced by subcutaneous injections of larvae. Am. J. vet. Res. 19 : 792-793.
- WADE A. E., FOX L. E., SWANSON L. E., 1960, Studies on infection and immunity with the cattle lungworm *Dictyocaulus viviparus* (Bloch). II. Reinfection immunity in guinea pigs. Am. J. vet. Res. 21 : 758-760.

Došlo dne 12. 11. 1970

TOMÁNEK J. (Naучно-исследовательский институт ветеринарии, Брно, Чехословакия). Экспериментальная инвазия гельминтом *Dictyocaulus viviparus* у морских свинок после парентерального применения личинок. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 431-437, 1971.

Было доказано, что после подкожного, внутримышечного и внутрибрюшного введения инвазионных личинок *Dictyocaulus viviparus* происходит инвазия в легкие морских свинок и установленное количество личинок через 3 дня после применения незначительно отличается от количества личинок, установленных после инвазии через рот. Развитие личинок, облученных 20 кР, вводимых подкожно морским свинкам, протекало так же, как и у личинок, облученных той же экспозицией, которая применялась через рот. У личинок, облученных 40 кР, были установлены различия на 10 день после инвазии. У личинок, облученных высокими дозами 80—120 кР, было установлено, что после пероральной инвазии личинки мигрируют в легкие морских свинок в большем количестве, чем подкожно вводимые личинки. Установленные данные служат в качестве основания для дальнейших опытов по иммунизации животных парентерально вводимыми личинками.

инвазионные личинки; ионизирующее излучение; легкие; миграция

TOMÁNEK J. (Veterinary Research Institute, Brno, Czechoslovakia). *Experimental Invasion of Guinea Pigs with the Cattle Lungworm Dictyocaulus viviparus by Parenteral Injections of Larvae*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 431-437, 1971.

It was proved that after the s. c., i. m. and i. p. application of the *Dictyocaulus viviparus* invasion larvae an invasion to the lungs of the guinea-pigs occurs; the numbers of larvae found in 3 days after the application do not substantially differ from those found after the invasion per os. The development of the larvae irradiated with 20 kR and applied s. c. in guinea-pigs was equal to the course of development

of the larvae exposed to the same irradiation and applied *per os*. In the larvae exposed to 40 kR differences were found on the 10th day after the invasion. It was found in the larvae irradiated with the high expositions of 80–120 kR that after the peroral invasion the larvae migrate into the guinea-pigs lungs in higher numbers than those applied *s.c.* The data obtained serve as a basis for further experiments with immunization of the animals with the parenterally applied larvae.

invasion larvae; ionizing irradiation; lungs; migration

TOMÁNEK J. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno, Tschechoslowakei). *Experimentelle Invasion durch Dictyocaulus viviparus bei Meerschweinchen nach der parenteralen Larvenapplikation*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 431–437, 1971.

Es wurde nachgewiesen, daß nach *s.c.*, *i.m.* und *i.p.* — Applikation der Invasionslarven *Dictyocaulus viviparus* es zu einer Invasion in die Lungen der Meerschweinchen kommt und die während 3 Tagen nach der Applikation festgestellten Larvenanzahlen unterscheiden sich wesentlich nicht von der nach der Invasion *per os* festgestellten Larvenanzahl. Die Entwicklung der mittels 20 kR bestrahlten Larven, die den Meerschweinchen *s.c.* appliziert wurden, verlief auf dieselbe Weise wie bei den mit derselben Exposition bestrahlten Larven, die *per os* appliziert wurden. Bei den mit 40 kR bestrahlten Larven wurden am 10. Tage nach der Invasion Unterschiede ermittelt. Bei den mit hohen Expositionen von 80–120 kR bestrahlten Larven wurde festgestellt, daß nach der peroralen Invasion die Larven in einer höheren Anzahl in die Lungen der Meerschweinchen migrieren als die *s.c.* applizierten Larven. Die festgestellten Erkenntnisse dienen als Unterlage für weitere Versuche mit der Tierimmunisierung durch parental applizierte Larven.

Invasionslarven; ionisierende Strahlung; Lungen; Migration

Adresa autora:

MVDr. J. Tománek, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství,
Brno - Medlánky

V/O MEDEXPORT



Veterinární nástroje

Vaginální zrcadla pro krávy a telata

Mléčné katetry

Nože břišní

Nože na kopyta

Nástroje na umělé oplodnění zvířat

Veterinární chirurgické soupravy, určené k chirurgickým operacím na zvířatech a ptactvu jak ve veterinárních léčebných zařízeních, tak na farmách nebo pastvinách při výjezdu přímo k nemocnému zvířeti

V/O MEDEXPORT SSSR, MOSKVA G-200

Telegrafická adresa: Moskva, Medexport

Telefon: 121-01-54 — Dálnopis: 247

POHLAVNÍ ROZDÍLY V ERYTROGRAMU DOSPĚLÉ DRŮBEŽE LB A PB V TROPICKÝCH PODMÍNKÁCH

E. Dobšínská

Vysoká škola veterinárská, katedra parazitologie a aplikované zoologie, Košice

DOBŠINSKÁ E. *Pohlavní rozdíly v erytrogramu dospělé drůbeže LB a PB v tropických podmínkách.* Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 439-448, 1971.

V práci byly stanoveny základní hodnoty červeného krevního obrazu u dospělé drůbeže v tropickém podnebí Kuby. Celkem bylo vyšetřeno 131 kusů drůbeže obou pohlaví plemene leghornka bílá (LB) a plymutka bílá (PB). Množství hemoglobinu, hematokritová hodnota a množství erytrocytů byly u kohoutů obou plemen vysoce signifikantně vyšší než u slepic. U plemene LB byla naměřena hemoglobinová hladina vyšší než u plemene PB. Hodnota hematokritová byla u plemene PB signifikantně vyšší než u plemene LB. Tyto plemenné rozdíly byly zjištěny však jen u slepic. Množství červených krvinek bylo vyšší u plemene LB, zvláště výrazný rozdíl byl zjištěn u slepic. Střední hemoglobinový obsah (SHO) byl u dospělých kohoutů obou plemen vysoce signifikantně vyšší než u slepic. U plemene LB byly hodnoty vyšší než u PB, statisticky vysoce významné rozdíly byly zachyceny pouze u slepic. Střední objem erytrocytu (SOČK) byl u kohoutů plemene LB vysoce signifikantně vyšší než u slepic. U plemene PB tomu bylo naopak, vyšší hodnoty byly zjištěny u slepic. Celkově vysoce signifikantně vyšší hodnoty byly vypočítány u plemene PB. Střední hemoglobinová koncentrace (SHK) byla u kohoutů obou plemen signifikantně vyšší než u slepic. Přitom u plemene LB jsou udávané hodnoty nepatrně vyšší.

dospělá drůbež; tropické podmínky; hemoglobin; hematokrit; množství erytrocytů; střední hemoglobinový obsah; střední objem erytrocytu; střední hemoglobinová koncentrace

Cílem této práce bylo stanovit základní hodnoty červeného krevního obrazu u dospělé drůbeže obou pohlaví v tropických podmínkách Kuby. Současně, vedle rozdílů pohlavních, se sledovaly i rozdíly mezi plemenné, a to mezi plemenem nosným LB a plemenem masným PB. Hematologická problematika u drůbeže zůstává stále aktuálním problémem, tím zajímavější je v oblastech klimaticky odlišných od mírného evropského pásma, jako je Kuba. Chov drůbeže se totiž právě v této zemi zařadil mezi nejdůležitější úseky živočišné výroby, nejen proto, že drůbeží maso a vejce patří k hlavním článkům tamnější stravy, ale i proto, že výroba tohoto masa je relativně rychlá a že drůbež je nejlepším konvektorem rostlinné bílkoviny na bílkovinu živočišnou. A protože budování velkochovu a koncentrace drůbeže přináší s sebou celou řadu chorob neinfekčních, infekčních a invazních, u kterých součástí diagnostických šetření je také hematologické vyšetření, rozhodli jsme se nejdříve stanovit základní hodnoty hematologické, z kterých by se v dalším mohlo vycházet.

Obdobnou problematikou, sledovanou z různých aspektů, se zabývala celá

řada autorů nejen našich, ale i zahraničních. Velmi skromné údaje z tropických oblastí nám však nedovolovaly porovnat námi dosažené výsledky s hodnotami jiných autorů.

Z Latinské Ameriky se zabýval touto problematikou pouze Quinteros (1963), který sledoval základní hematologické hodnoty u různých plemen dospělých slepic. Množství hemoglobinu u kuřat a nosnic, jeho závislost na pohlaví, tělesné váze a snůšce studovali na Havaji Tanaka a Rosenberg (1953). Podle jejich nálezů nebyla v hladinách hemoglobinu zjištěna sezónní závislost, což jmenovaní autoři vysvětlují tím, že celoroční teplota je zde téměř stejná. A konečně na Filipínách popisují Gonzaga a Albarece (1963) množství červených a bílých krvinek a hodnoty hematokritové u dospělých křepek obou pohlaví.

Z ostatních autorů citujeme jen některé, kteří studovali hematologickou problematiku v mírném evropském klimatu. Tak Lucas a Jamroz (1961) a Jantošovič (1965) sledovali jednotlivé hematologické hodnoty u dospělé drůbeže z hlediska plemenných rozdílů. Pohlavní rozdíly v množství erytrocytů studoval Lange (1932), Olson (1937), Domm a Taber (1946), Dukes (1955), Lucas a Jamroz (1961) a Jantošovič (1967). Dále pohlavní rozdíly v hematokritových hodnotách popisují Newell a Schaffner (1950), Sturkie a Textor (1960) Lucas a Jamroz (1961), Bierer a kol. (1964), Jantošovič (1967) a Lölliger a Schubert (1967). Rozdíly v množství hemoglobinu u dospělých kohoutů a slepic udávají Dukes a Schwarte (1931), Olson (1937), Tanaka a Rosenberg (1953), Lucas a Jamroz (1961) a Jantošovič (1967).

Střední objem erytrocytu, střední hemoglobinovou koncentraci a střední hemoglobinový obsah popisuje ve své práci pouze Gilbert (1965) a Wels (1966).

MATERIÁL A METODY

Veškeré vyšetřování bylo uskutečněno v měsících lednu až červnu r. 1967. Z klimatického hlediska se první polovina roku na Kubě dělí na dvě období, lišící se více množstvím vodních srážek a s tím související relativní vlhkostí, než teplotami. Období od ledna do poloviny dubna patří k tzv. období suchému, které na Kubě začíná přibližně v druhé polovině října a trvá do poloviny dubna.

I. Meteorologické údaje v provincii La Habana ve sledovaných měsících

Měsíc	Teploty °C	Vodní srážky mm	Relativní vlhkost %
Leden	21,7	60,7	77
Únor	22,1	41,4	75
Březen	23,1	47,8	75
Duben	24,4	50,2	75
Květen	25,5	102,3	78
Červen	26,4	145,6	81
Červenec	27,0	101,6	80

Koncem dubna, někdy až začátkem května, začíná potom období dešťů, které vrcholí v září a říjnu cyklonovým počasím (tab. I).

Všechny vyšetřovaný materiál pocházel z plemenných chovů drůbeže. K šetření byli použiti kohouti a slepice plemene leghornka bílá a plymutka bílá ve stáří 11–13 měsíců. Každé plemeno pocházelo z jednoho hospodářství, která byla ve vnitrozemí provincie La Habana a byla od sebe vzdálena asi 40 km. Drůbež byla chována na hluboké podestýlce z hoblovaček v otevřených, pouze zastřešených halách; zoohygienické i výživné podmínky byly stejné. Drůbež byla krmena obchodními směsmi, které byly podávány (stejně jako pitná voda) v automatech. Zdravotní i výživný stav drůbeže byl dobrý.

Hematologická šetření byla provedena celkem u 131 kusu drůbeže, z toho u 65 kusů plemene LB a u 66 kusů plemene PB. Sledovány byly následující hodnoty: množství červených krvinek, hladina hemoglobinu, hodnota hematokritu, celkový objem erytrocytu, celková hemoglobinová koncentrace a celkový hemoglobinový obsah.

Krev byla odebírána vždy v dopoledních hodinách, mezi 8.—10. hodinou, zpracována byla během tří hodin po odběru. Odebírala se z *v. ulnaris* do stříkačky předem propláchnuté roztokem heparinu.

Množství hemoglobinu se zjišťovalo metodou cyanhemoglobinovou (Skala a Matysková 1965). Po přidání vyšetřované krve k transformačnímu Drabkinovu roztoku se vytvořil precipitát jaderných substancí, který se odstraňoval centrifugací po dobu 3 minut při 1500 otáčkách/1 min. (Wels a Horn 1965).

Ke stanovení množství červených krvinek byl použit roztok Natt—Herrickův (Celer 1969), krvinky byly počítány v Bürkerově komůrce obvyklým způsobem.

Hematokritové hodnoty se určovaly v hematokritových Wintrobových zkumavkách tak, že se centrifugovaly při 3000 otáčkách/min. po dobu 30 minut (Schalm 1965).

Střední objem erytrocytu (SOČK), střední hemoglobinová koncentrace (SHK) a střední hemoglobinový obsah (SHO) byly vypočítány podle všeobecně platných vzorců.

Všechny výsledky byly matematicko-statisticky zhodnoceny. Rozdíly mezi plemenné a mezipohlavní byly zhodnoceny testovou charakteristikou *F*, přičemž za statisticky vysoce významné považujeme rozdíly, u kterých bylo zjištěno $p < 0,01$ a za statistický významné, kde bylo $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Ve vlastní práci jsme se zaměřili na zhodnocení dosažených výsledků červeného krevního obrazu u dospělé drůbeže ze dvou aspektů: z hlediska pohlavních rozdílů a z hlediska plemenných rozdílů.

V první části bylo vyšetřeno 65 kohoutů a 66 slepic, z čehož 33 kohouti byli plemene LB a 32 plemene PB, 32 slepice LB a 34 plemene PB.

Získané výsledky je možno sledovat z tabulky č. II a III, kde jsou zachyceny jednotlivé hodnoty u slepic a u kohoutů obou plemen odděleně, a z tabulky IV, kde jsou vyhodnoceny dosažené výsledky pouze s ohledem na rozdíly pohlavní.

Z uvedených hodnot vyplývá, že množství hemoglobinu, hodnota hematokritu, počet červených krvinek, střední hemoglobinová koncentrace a střední hemoglobinový obsah je u kohoutů obou plemen podstatně vyšší než u slepic.

II. Hodnoty červeného krevního obrazu u dospělé drůbeže plemene LB

Hematologické hodnoty	Kohouti	Slepice	$\bar{x}$	$\pm s$	min.	max.	$s\bar{x}$	V
Hemoglobin g%	33		12,9	1,8	9,2	16,4	0,30	13,6
		32	9,6	0,5	8,7	10,9	0,08	5,0
Hematokrit %	33		37,1	3,6	30,9	43,8	0,62	9,7
		32	30,5	3,1	24,0	35,5	0,55	10,2
Erytrocyty/1cmm krve	33		3 149 000	375 000	2 420 000	3 760 000	65,37	11,9
		32	2 832 000	328 000	2 340 000	3 570 000	58,04	11,6
SOČK v μ^3	33		118,8	13,9	96,7	144,8	2,40	11,7
		32	109,2	17,3	81,2	134,6	3,00	15,8
SHO v pg	33		41,5	6,5	29,4	54,0	1,10	15,6
		32	32,0	6,0	23,1	42,3	1,00	18,7
SHK v %	33		34,7	5,2	24,8	43,3	0,90	15,0
		32	28,9	3,9	22,8	42,4	0,70	13,6

III. Hodnoty červeného krevního obrazu u dospělé drůbeže plemene PB

Hematologické hodnoty	Kohouti	Slepice	$\bar{x}$	$\pm s$	min.	max.	$s\bar{x}$	V
Hemoglobin g%	32		12,9	1,5	10,0	15,5	0,26	11,5
		34	9,0	0,8	7,4	11,4	0,13	8,5
Hematokrit %	32		37,7	3,3	32,0	44,0	0,58	8,8
		34	32,2	1,9	28,0	36,0	0,31	5,8
Erytrocyty/1 cmm krve	32		3 111 000	420 260	2 470 000	3 890 000	74,30	13,5
		34	2 507 000	258 000	2 010 000	2 960 000	44,30	10,3
SOČK v μ^3	32		122,5	15,7	85,8	149,6	2,80	12,8
		34	129,0	13,3	105,6	163,1	2,30	10,3
SHO v pg	32		40,1	7,6	26,1	54,5	1,30	18,9
		34	37,6	5,0	27,0	53,5	0,90	13,3
SHK v %	32		32,4	5,2	24,7	45,1	0,90	16,2
		34	29,2	3,8	22,7	38,6	0,70	13,1

IV. Pohlavní rozdíly v erytrogramu dospělé drůbeže

Kohouti	Hb g%	Hk %	Er 10 ⁶	SHO pg	SOČK /μ ³	SHK %
<i>n</i>	65	65	65	65	65	65
$\bar{x}$	12,9	37,4	3,1	40,8	120,6	33,6
$\pm s$	1,6	3,4	0,4	7,0	14,8	5,2
<i>V</i>	12,4	9,3	12,7	17,2	12,2	15,6
Slepice						
<i>n</i>	66	66	66	66	66	66
$\bar{x}$	9,3	31,3	2,7	34,9	119,4	29,1
$\pm s$	0,6	2,5	0,3	5,5	15,3	3,8
<i>V</i>	6,7	8,0	10,9	16,0	13,0	13,3

Pohlavní rozdíly v těchto hodnotách jsou ve všech případech vysoce signifikantní ($p < 0,01$).

Sledujeme-li variační koeficienty v těchto hodnotách, vidíme, že u kohoutů plemene PB jsou vyšší než u slepic, zatímco u kohoutů LB jsou nižší v hodnotě hematokritu a ve středním hemoglobinovém obsahu než u slepic. Při mezipohlavním posuzování variačních koeficientů vidíme, že u kohoutů jsou ve všech ukazatelích vyšší než u slepic. Výjimku činí pouze SOČK, který je u slepic nepatrně vyšší.

Plemenné rozdíly u dospělé drůbeže byly sledovány u dvou plemen — leg-hornka bílá a plymoutka bílá, přičemž z prvního plemene bylo vyšetřeno 65 kusů a z druhého 66 kusů.

Z výsledků, které jsou shrnuty v tabulce V, můžeme říci, že množství červených krvinek je u plemene LB vysoce signifikantně vyšší než u plemene PB. Hladina hemoglobinu a střední hemoglobinová koncentrace je u drůbeže plemene LB také nepatrně vyšší, plemenné rozdíly jsou však statisticky nevýznamné. Variační koeficienty obou těchto hodnot jsou téměř stejné. Naproti tomu u ple-

V. Plemenné rozdíly v hodnotách erytrogramu u dospělé drůbeže

Plemeno LB	Hb g%	Hk %	Er 10 ⁶	SHO pg	SOČK /μ ³	SHK %
<i>n</i>	65	65	65	65	65	65
$\bar{x}$	11,3	33,9	3,0	36,3	114,1	31,8
$\pm s$	1,2	3,4	0,3	6,3	15,6	4,5
<i>V</i>	10,6	9,6	10,0	17,2	13,6	14,1
Plemeno PB						
<i>n</i>	66	66	66	66	66	66
$\bar{x}$	10,9	34,8	2,8	38,8	125,9	30,8
$\pm s$	1,2	2,6	0,4	6,3	14,5	4,5
<i>V</i>	10,5	7,4	12,8	16,2	11,5	14,6

mene PB byla zjištěna vyšší hematokritová hodnota, plemenný rozdíl byl signifikantní ($p < 0,05$), avšak variační koeficient u tohoto plemene byl nižší. Střední objem erytrocytu je také u PB statisticky významně vysoce vyšší a variační koeficient nižší. Střední hemoglobinový obsah je u plemene PB sice vyšší, tento rozdíl však je nesignifikantní. Variační koeficient je o něco nižší.

DISKUSE

Úvodem této kapitoly je třeba zdůraznit, že veškerá vyšetřovaná drůbež pocházela z klimatických podmínek tropických, naprosto odlišných od mírného evropského klimatu, že se tedy zoohygienické podmínky i systém výživy v tomto klimatickém pásmu značně liší od podmínek našich. Zdůrazňuji tyto body proto, že v některých případech dochází v základních hematologických hodnotách k určitým rozdílům, i když nijak pronikavým, a domnívám se, že mohou být ovlivněny právě výše jmenovanými faktory.

Hladina hemoglobinu u dospělých kohoutů obou plemen byla vysoce signifikantně vyšší ($p < 0,01$ — 12,9 g%) než u dospělých slepic (9,3 g%). Tyto pohlavní rozdíly odpovídají všem literárním citacím uváděným v literárním přehledu a jsou závislé, stejně jako u červených krvinek, na stimuluujícím vlivu androgenů (Dom m a Taber 1945).

Porovnají-li se popsané údaje v množství hemoglobinu zvláště u slepic a zvláště u kohoutů s pracemi jednotlivých autorů, zjistí se, že speciálně u slepic se shodují s nálezy Dukesa a Schwarteho (1931), Olsona (1937), Bankowského (1942), Lucase a Jamroze (1961) a Quinterose (1963), avšak u kohoutů se s mnohými rozcházejí. Dukes a Schwarte (1931) a Lucas a Jamroz (1961) např. popsali hodnoty vyšší, jiní naopak nižší (Olson 1937; Tanaka a Rosenberg 1953). V žádném případě však tyto rozdíly nejsou příliš výrazné, ale jsou pravděpodobně způsobeny rozdíly plemennými, věkovými, způsobem chovu a komplexem dalších příčin.

S názory Lucase a Jamroze (1961) a Jantošoviče (1965) se rozcházejí v otázce plemenných rozdílů. Jmenovaní autoři našli totiž vyšší hladinu hemoglobinu u těžkých plemen, zatímco já naopak u lehkých plemen, což je vysoce signifikantní právě u slepic.

Hodnota hematokritová byla zjištěna u dospělých kohoutů (37,4 %) rovněž statisticky vysoce významně vyšší ($p < 0,01$) než u slepic (31,3 %), což je v souladu se všemi literárními prameny. Dále se shodují i nálezy u dospělých slepic s údaji Sturkieho a Textora (1960), Lucase a Jamroze (1961), Quinterose (1963) a Jantošoviče (1965). Rozcházejí se však s těmito autory, včetně Newella a Schaffnera (1950), v hematokritových hodnotách u kohoutů, které jsou v této práci udávány mnohem nižší. Při studiu plemenných rozdílů byl nalezen u dospělé drůbeže masných plemen hematokrit signifikantně vyšší ($p < 0,05$). Obdobně ve své práci Jantošovič (1965) našel u slepic NH hematokritové hodnoty vyšší než u slepic LB. Lucas a Jamroz (1961) uvádějí, že jak počet erytrocytů, tak i hematokrit je vyšší u plemene LB.

Množství červených krvinek se pohybuje u kohoutů kolem 3 130 000 a u slepic kolem 2 660 000/1 mm³ krve, přičemž u slepic plemene LB jsou hodnoty signifikantně vyšší než u slepic PB. Tyto údaje se přibližují hodnotám udávaným Olsonem (1937), Dukesem (1947) a Jantošovičem

(1965), jsou však o něco málo nižší. Lucas a Jamroz (1961) na rozdíl od předchozích zjistili u obou pohlaví plemene LB hodnoty podstatně vyšší, Doom a Taber (1946) zaznamenali vyšší počet červených krvinek pouze u kohoutů.

Naše nálezy se přibližují nejvíce Quinterosovi (1963), který vyšetřoval slepice masných i nosných plemen v oblasti Latinské Ameriky. Tato přibližná shoda údajů by snad mohla opravňovat k domněnce, že v těchto klimatických oblastech, stejně jako u lidí, dochází k mírné erytrocypopenii.

Na počet erytrocytů mají vliv i různá plemena. Z předcházejících zjištění vyplývá, že množství červených krvinek je statisticky významně vyšší u dospělé drůbeže plemene LB, jak uvádějí i Lucas a Jamroz (1961), zatímco v Jantošovičových (1965) nálezech tyto rozdíly byly nesignifikantní.

Při studiu pohlavních rozdílů byly nalezeny u kohoutů obou plemen počty červených krvinek vysoce významně vyšší než u slepic, což je v souladu s údaji téměř všech autorů, kteří stejně jako Sturkie (1967) považují tento jev za příčinu stimulačního vlivu androgenů.

U dospělé drůbeže plemene LB je střední objem erytrocytu signifikantně vyšší u kohoutů než u slepic. Naprosto opačná situace je však u plemene PB. Je možné proto souhlasit s nálezem Gilberta (1965), který vyšetřoval jen plemeno leghorn. Střední hemoglobinový obsah i střední hemoglobinová koncentrace byla u kohoutů obou plemen vysoce signifikantně vyšší než u slepic. Wells (1966) u kohoutů Hyline udává všechny hodnoty mnohem nižší, než jaké byly stanoveny v této práci.

Z plemenného hlediska je u dospělé drůbeže střední hemoglobinový obsah a střední objem erytrocytu vyšší u plemene masného, zatímco u plemene nosného je nepatrně vyšší střední hemoglobinová koncentrace.

Literatura

- BANKOWSKI R. A., 1942, Studies of the Hemoglobin content of Chicken blood and evaluation of Methods for its determination. Am. Journ. Vet. Res. 3 : 372.
- BIERER B. W., ELEAZER T. H., ROEBUCK D. E., 1964, Erythrocyte Sedimentation Rates and Packed Erythrocyte Volumes of Blood from Chickens and Turkeys. J. of the Amer. Vet. Med. Assoc. 145 : 47-48.
- CELLER V., 1960, Příspěvek k hematologii drůbeže. Sborník VŠZ Brno, sp. VF VIII : 130-134.
- DOMM L. V., TABER E., 1946, Endocrine Factors controlling erythrocyte concentration in the blood of the Domestic fowl. Physiol. Zool. 19 : 258-281.
- DUKES H. H., 1955, Fisiología de los animales domesticos, New York.
- DUKES H. H., SCHWARTE L. H., 1931, The Hemoglobin content of the Blood of Fowls. Amer. J. Physiol. 96 : 89-93.
- GILBERT A. B., 1965, Sex differences in the Erythrocyte of the Adult Domestic Fowl. Res. in Vet. Sci. 6 : 114-116.
- GONZAGA A. C., ALBARECE S. C., 1963, Observations on the erythrocyte and leucocyte counts and packed cell volume of the Japanese quail. The Philip. J. of Vet. Med. II : 227-234.
- JANTOŠOVIČ J., 1965, Krvný obraz u zdravé hrabavej hydiny v našich podmienkach. Kand. disert. práca.
- JANTOŠOVIČ J., 1967, Krvný obraz u kura domáceho. Fol. vet. XI : 159-170.
- LÖLIGER H. CH., SCHUBERT H. J., 1967, Der Hämatokritwert von gesunden und kranken Hühnern verschiedener Altersgruppen und sein diagnostischer Anwendungsbereich. Berl. u. Münch. Tierärztl. Wochenschrift 80 : 171-176.
- LUCAS A. M., JAMROZ C., 1961, Atlas of Avian Hematology.

- NEWELL C. W., SCHAFFNER C. S., 1950, Blood volume determinations in chickens. *Poult. Sci.* 29 : 78-87.
- OLSON C., 1937, Variations in the cells and hemoglobin content in the blood of the normal domestic chickens. *Cornell Vet.* 27 : 235-263.
- QUINTEROS I. R., 1963, Valores hematológicos y índices hematométricos en una especie aviar (*Gallus gallus domesticus*). *Rev. de Med. Vét.* 44 : 119-125.
- SCHALM O. W., 1964, Hematología veterinaria, Mexico.
- SKALA E., MATYSKOVÁ L., 1965, Určování hemoglobinu v krvi. *Prakt. lékař* 45 : 512-514.
- STURKIE P. D., 1967, Fisiología aviar. Zaragoza.
- STURKIE P. D., TEXTOR K., 1960, Sedimentation Rate of Erythrocytes in Chickens as Influenced by Method and Sex. *Poult. Sci.*, 37 : 60-63.
- TANAKA T., ROSENBERG H. M., 1953, Relationship between Hemoglobin Levels in Chickens and Certain Characters of Economic Importance. Honolulu, Hawaii : 821-827.
- WELS A., HORN V., 1965, Beitrag zur Hämoglobin-Bestimmung im Blut des Geflügels. *Zentralbl. f. Veterinärmed.* 12 : 663-669.
- WELS A., 1966, Die Änderung des roten Blutbildes beim Huhn während und nach einer sechstägigen Durstperiode. *Zentralbl. f. Veterinärmed.* 13 : 246-251.

Došlo dne 10. 6. 1970

ДОБШИНСКА Э. (Ветеринарный институт, Кошице, Чехословакия). Половые различия в эритрограмме взрослой птицы ЛБ и ПБ в тропических условиях. *Vet. Med. (Praha)* 16 (7) : 439-448, 1971.

В работе устанавливали основные величины красной картины крови взрослой птицы в тропическом климате Кубы. Всего исследована 131 птица обоих полов пород Леггорн белый и Плимутрок белый. Количество гемоглобина, гематокритовая величина и количество эритроцитов у петухов обеих пород высокосignificantly выше, чем у кур. У ЛБ уровень гемоглобина выше, чем у ПБ. У ПБ величина гематокрита значимо выше, чем у ЛБ. Однако эти породные различия установлены лишь у кур. Количество красных кровяных телец больше у ЛБ, особенно у кур. Среднее содержание гемоглобина (ССГ) у взрослых петухов обеих пород высокосignificantly больше, чем у кур. Величины ЛБ выше, чем у ПБ, но статистически высокосignificantные различия отмечены лишь у кур. Средний объем эритроцитов (СОЭ) у петухов ЛБ больше, чем у кур, а у ПБ наоборот. Высокосignificantные более высокие величины вычислены вообще у ПБ. Средняя гемоглобиновая концентрация (СГК) у петухов обеих пород значительно больше, чем у кур. При этом у ЛБ эти величины несколько выше.

взрослая птица; тропические условия; гемоглобин; гематокрит; количество эритроцитов; среднее содержание гемоглобина; средний объем эритроцитов; средняя концентрация гемоглобина

DOBŠINSKÁ E. (University of Veterinary Medicine, Košice, Czechoslovakia). *Sexual Changes in Erythrogram of Mature WL and WP Poultry in Tropical Conditions*. *Vet. Med. (Praha)* 16 (7) : 439-448, 1971.

The fundamental values of erythrogram in mature poultry were determined in the tropical clima of Cuba. On the whole 131 birds of both sexes of White Leghorn and White Plymouth breed were examined. The hemoglobin level, the hematocrit value and the erythrocytes number were in cocks of both breeds significantly higher than in hens. As for the hemoglobin level, it was higher in White Leghorn than in White Plymouth breed. The hematocrit value was found in the WP significantly higher than in WL breed. However, these differences in breeds were observed only in hens. The erythrocytes number was higher in WL breed, an especially significant difference was found in hens. The mean corpuscular hemoglobin (MCH) was in mature cocks of both breeds significantly higher than in hens. In WL breed the values were higher than in WP breed, the statistically highly significant differences were

recorded only in hens. The mean corpuscular volume (MCV) was in WL cocks significantly higher than in hens. To the contrary, in the WP breed the higher values were ascertained in hens. The totally significantly higher values were found in WP breed. The mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) was in cocks of both breeds significantly higher than in hens. As for WL breed, the given values are slightly higher.

mature poultry; tropical conditions; hemoglobin; hematocrit; erythrocytes amount; mean corpuscular hemoglobin; mean corpuscular volume; mean corpuscular hemoglobin concentration

DOBSINSKÁ E. (Hochschule für Veterinärmedizin, Košice, Tschechoslowakei). *Sexuelle Unterschiede im Erythrogramm erwachsener Hühner der Weißen Leghorn- und der Plymouthrasse unter tropischen Bedingungen*. Vet. Med. (Praha) 16 (7): 439-448, 1971.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grundwerte des roten Blutbilds erwachsener Hühner unter den tropischen Bedingungen Kubas bestimmt. Insgesamt wurden 131 Stück Geflügel beiderlei Geschlechtes der Rassen Weißes Leghorn und Weißes Plymouth untersucht. Die Hämoglobin- und Hämatokritwerte sowie die Erythrozytenmengen waren bei Hähnen beider Rassen signifikant höher als bei Hennen. Bei der WL-Rasse wurde ein höherer Hämoglobinspiegel im Vergleich zur WP-Rasse festgestellt. Der Hämatokritwert war bei der WP-Rasse signifikant höher als bei der WL-Rasse. Diese Rassenunterschiede wurden aber nur bei Hennen vorgefunden. Die Erythrozytenmenge war bei der WL-Rasse höher. Besonders ausgeprägt war dieser Unterschied bei Hennen. Der durchschnittliche Hämoglobingehalt (DHG) war bei erwachsenen Hähnen beider Rassen hochsignifikant höher als bei Hennen. Bei der WL-Rasse waren die Werte höher als bei der WP-Rasse. Statistisch signifikante Unterschiede wurden aber nur bei Hennen festgestellt. Das durchschnittliche Erythrozytenvolumen (DEV) war bei Hähnen der WL-Rasse hochsignifikant höher als bei Hennen dieser Rasse. Bei der WP-Rasse war es umgekehrt, höhere Werte wurden bei Hennen festgestellt. Hochsignifikant höhere Werte wurden allgemein bei der WP-Rasse errechnet. Die durchschnittliche Hämoglobinkonzentration (DHK) war bei Hähnen beider Rassen signifikant höher als bei Hennen. Dabei waren die Werte bei der WL-Rasse gering höher.

erwachsenes Geflügel; tropische Bedingungen; Hämoglobin; Erythrozytenmenge; durchschnittlicher Hämoglobingehalt; durchschnittliches Erythrozytenvolumen; durchschnittliche Hämoglobinkonzentration

Adresa autorky:

MVDr. E. Dobšínská, CSc., Vysoká škola veterinárska, Košice, Komenského 71

ARYLAMIDÁZOVÁ AKTIVITA V KRVNÝCH SÉRACH DOMÁCICH ZVIERAT

M. Bartík, E. Michnová

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

Venované k 65. narodeninám prof. dr. A. Janečka

BARTÍK M., MICHNOVÁ E. *Arylamidázová aktivita v krvných sérach domácich zvierat*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 449-456, 1971.

Zisťovali sa normálne aktivity enzýmov hydrolyzujúcich L-leucyl-p-nitroanilid (leucylarylamidáza) v krvných sérach domácich zvierat. Previedli sa tiež niektoré kinetické štúdie. Aktivity sérovej leucylarylamidázy u dospelých zdravých zvierat majú nasledovné hodnoty: kravy ($n = 30$) $5,55 \pm 1,30$; ovce ($n = 21$) $10,44 \pm 1,37$; kone ($n = 15$) $6,02 \pm 1,08$; ošípané ($n = 32$) $20,44 \pm 2,39$ mikromolov p-nitroanilínu. Enzymatická aktivita je vyjadrená množstvom uvoľneného p-nitroanilínu v mikromoloch na 1000 ml séra za minútu pri 30 °C. pH-optimum účinku enzýmu v TRIS/HCl pufoch je 7,5. Leucylarylamidázy sú inaktivované behom 60 minút a 30 °C pri nižšom pH ako 5,5 a vyššom ako pH 10,0. Pôvodná aktivita enzýmov v sére sa nemenila pri uchovávaní v chladničke pri 4 °C počas piatich dní, pri teplote 25 °C enzým bol stabilný tri dni a pri 37 °C v priebehu dvoch dní. Hodnoty K_M pre L-leucyl-p-nitroanilid a leucylarylamidázu séra kráv, koní, oviec a ošípaných činia: $5,5 \cdot 10^{-4}$; $5,9 \cdot 10^{-4}$; $2,8 \cdot 10^{-4}$; $8,3 \cdot 10^{-4}$ Mol/liter. Údaje sa vzťahujú na nepurifikované enzýmy.

arylamidázové enzýmy; krvné sérum; krava; kôň; ovca; ošípaná

Aktivita a vlastnosti aminopeptidáz krvného séra ľudí boli predmetom štúdia viacerých autorov (Behal a kol. 1964, Fleisher a kol. 1964, Gommori 1964, Nachlas a kol. 1962, Rybák a kol. 1966, 1967, Tuppy a kol. 1962). Uvedené práce riešili jednak problémy metodické s určením základných fyzikálno-chemických vlastností aminopeptidáz, ako aj možnosť ich využitia pre účely enzymatickej diagnostiky. Vo veterinárnej medicíne je zatiaľ málo prác zameraných na túto tematiku. Z diagnostického aspektu aminopeptidázami krvného séra sa zaoberali Šlesinger (1965, 1966a, b), Lettow a Jaeger (1963, 1965), Malinowska (1965), Malinowska a Tomický (1965) a Darcel (1969), ovšem bez ich bližšej špecifikácie.

Úkolom tejto práce, ktorá nadväzuje na predchádzajúce dva naše články (Bartík, Blahovec 1971, Blahovec a kol. 1971), je preto sledovať štiepenie L-leucyl-p-nitroanilidu (L-Leu-NAP) enzýmami krvných sér niektorých druhov domácich zvierat a pokúsiť sa o bližšiu charakteristiku enzýmov zodpovedných za tento druh hydrolýzy. Aminopeptidázy, ktoré štiepia aminokyselinové deriváty β -naftylamínu, alebo p-nitroanilínu boli v poslednej dobe nazvané arylamidázami (Patterson a kol. 1963, 1965). Enzým, ktorý hydrolyzuje L-Leu-NAP, budeme nazývať leucylarylamidáza.

MATERIÁL A METÓDY

ROZTOKY, PRÍSTROJE A BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Za zásobný roztok substrátu slúžil 10^{-2} M L-leucyl-p-nitroanilid (Schuchardt-München) v 10^{-2} N HCl. Pre prípravu inkubačných zmesí sa použili 0,05 M TRIS/HCl pufr a univerzálne pufr podľa Brittona a Welfoorda, zloženie ktorých udáva literatúra (Biochemists' Handbook, London 1961).

Ako zdroj enzýmu sa použili krvné séra klinicky zdravých oviec, hovädzieho dobytká, ošipáných a koní. Krvné séra boli skladované v ľadničke pri $0^{\circ} \pm 4^{\circ}\text{C}$ a spracované najneskôr do 24 hodín po odbere krvi.

Fotometrické merania sa prevádzali na spektrálnom fotometri SF 4 s použitím kyvety o objeme $1,5\text{ cm}^3$ a špeciálneho držiaka kyviet. Kontrola pH pufrův a inkubačných zmesí sa diala sklenenou elektródou na pH-metri LP 58.

PRACOVNÝ POSTUP

Pre stanovenie aktivity sérovej leucylarylamidázy bola zvolená metodika vypracovaná Tuppm a kol. (1962), ktorá pre naše podmienky a potreby bola upravená nasledovne: ku 0,7 ml TRIS/HCl pufru o pH 7,5 sa pridá 0,2 ml séra a 0,1 ml zásobného roztoku substrátu. (Výsledná koncentrácia L-Leu-Nap v inkubačnej zmesi je 10^{-3} M.) Zmes po premiešaní sa nechá inkubovať 30 minút pri teplote 30°C a inkubácia sa preruší pridaním 0,5 ml 10^{-1} N HCl. Tento spôsob inkubácie neovplyvňuje badateľne ani spektrálnu charakteristiku substrátu, ani p-nitroanalínu. Prevedené zmeny oproti uvedenému metodickému postupu sú popísané v ďalšom texte, alebo pri obrázkoch.

p-nitroanilín, uvoľnený počas inkubácie, sa stanovuje meraním extinkcie pri 400 nm proti kontrolnému pokusu, pri ktorom sa substrát pridáva ku inkubačnej zmesi až po inaktivácii enzýmu kyselinou soľnou.

Enzymatická aktivita leucylarylamidázy je vyjadrená množstvom uvoľneného p-nitroanilínu v mikromoloch na 1000 ml séra za minútu pri 30°C .

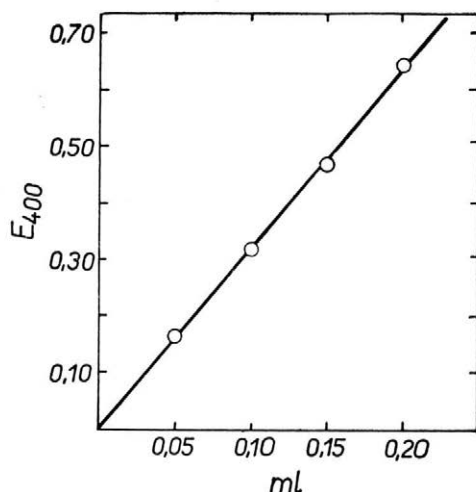
VÝSLEDKY

VPLYV KONCENTRÁCIE ENZÝMU NA HYDROLÝZU SUBSTRÁTU

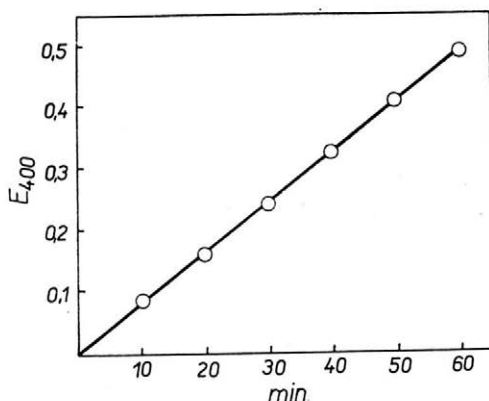
Priebeh hydrolýzy L-Leu-Nap v závislosti na množstve enzýmu udáva obr. 1. V našich podmienkach koncentrácia enzýmu je vyjadrená množstvom séra v ml. V danom experimente bolo použité ovčie sérum v množstve 0,05, 0,10, 0,15 a 0,20 ml. Celkový objem inkubačnej zmesi po pridaní substrátu a TRIS/HCl pufru (pH 7,5) bol 1 ml.

ZÁVISLOSŤ HYDROLÝZY SUBSTRÁTU NA DOBE INKUBÁCIE

Sledovala sa závislosť hydrolýzy L-Leu-Nap leucylarylamidázou séra oviec v 10minútových intervaloch po dobu 60 minút. Priebeh hydrolýzy substrátu pri rôznej inkubačnej dobe ukazuje obr. 2. Dosiahnuté výsledky, znázornené na obr. 1 a 2, potvrdzujú, že zvolená koncentrácia krvného séra (enzýmu) a použitá inkubačná doba v našom pracovnom postupe vyhovujú metodickým požiadavkám.



1. Hydrolýza L-Leu-NAP v závislosti na koncentrácii enzýmu (na množstve séra v inkubačnej zmesi); 1 ml inkubačného roztoku o pH 7,5 obsahuje 0,05, 0,10, 0,15 a 0,20 ml séra; koncentrácia substrátu 10^{-3} M L-Leu-NAP; inkubované pri 30°C ; množstvo hydrolýzou vzniklého p-nitroanilínu je udané hodnotou extinkcie pri 400 nm



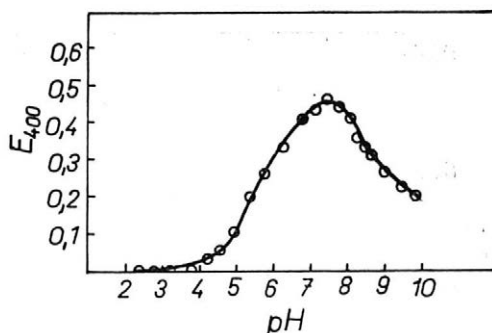
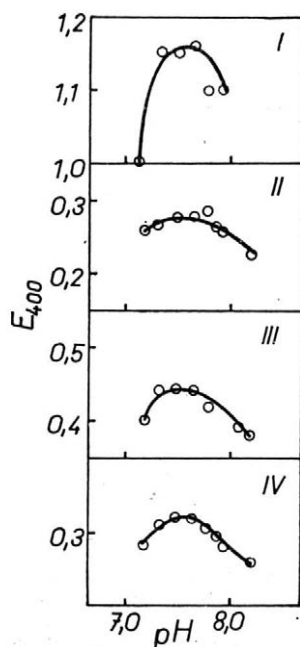
2. Hydrolýza L-Leu-NAP leucylarylamidázou ovčieho séra v závislosti na dobe inkubácie; zloženie inkubačnej zmesi: 0,7 ml TRIS/HCl pufer pH 7,5; 0,2 ml séra a 0,1 ml 10^{-2} M L-Leu-NAP; inkubované pri 30°C ; zastavenie hydrolýzy sa dialo pridaním 0,5 ml 10^{-1} N HCl k inkubačnej zmesi

VPLYV pH NA RÝCHLOSŤ HYDROLÝZY L-LEUCYL-P-NITROANILIDU

Závislosť aktivity leucylarylamidázy na pH sa prešetrila u enzýmov krvného séra oviec, hovädzieho dobytká, ošípaných a koní. Stanovovala sa vždy v dvoch paralelných pokusoch. Účinok pH prostredia na enzymatickú aktivitu sa sledoval v rozsahu pH 7,2–8,0 a tiež v širšom rozmedzí pH 2,5–9,8. Úprava pH inkubačných zmesí pre hodnoty pH 2,5–6,8 sa prevádzala univerzálnymi puframi a v rozmedzí pH 7,2–9,8 TRIS/HCl puframi. K prerušeniu inkubácie pri vzorkách o pH nad 8,0 bolo nutné použiť 0,5 ml 1 N HCl (pri nižších hodnotách pH pre tieto účely dostačovala 10^{-1} N HCl). Leucylarylamidázy všetkých sledovaných krvných sér maximálne hydrolyzovali substrát v rozmedzí pH 7,5–7,7. Závislosť enzymatickej aktivity na pH v širšom rozmedzí pH 2,5–9,8 dokumentujeme iba u leucylarylamidázy krvného séra hovädzieho dobytká, keďže táto závislosť u ostatných druhov zvierat je rovnaká (obr. 3 a 4).

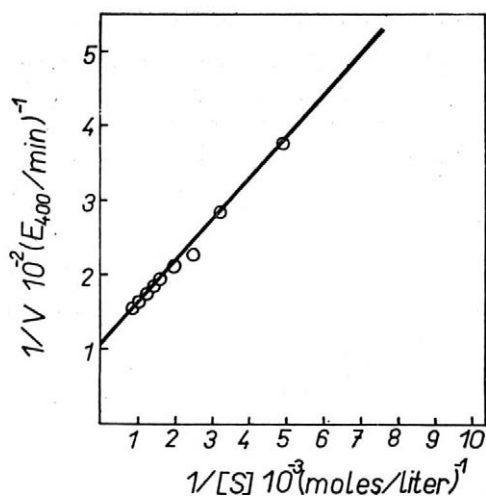
ZÁVISLOSŤ AKTIVITY ENZÝMU NA KONCENTRÁCII SUBSTRÁTU A HODNOTA K_M

Vzťah medzi koncentráciou substrátu a rýchlosťou hydrolýzy katalyzovanej sérovými leucylarylamidázami sa sledoval pri pH 7,5 a teplote 30°C . Boli použité nasledovné koncentrácie substrátu: 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $6 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, $8 \cdot 10^{-4}$, $9 \cdot 10^{-4}$, $10 \cdot 10^{-4}$ M L-Leu-NAP v celkovej inkubačnej zmesi. Ako zdroj enzýmu sa použili zmesné séra jednotlivých druhov zvierat. Výpočet K_M bol prevedený graficky (obr. 5) postupom podľa Lineweavera a Burka (1934) a získané hodnoty udáva tabuľka I.

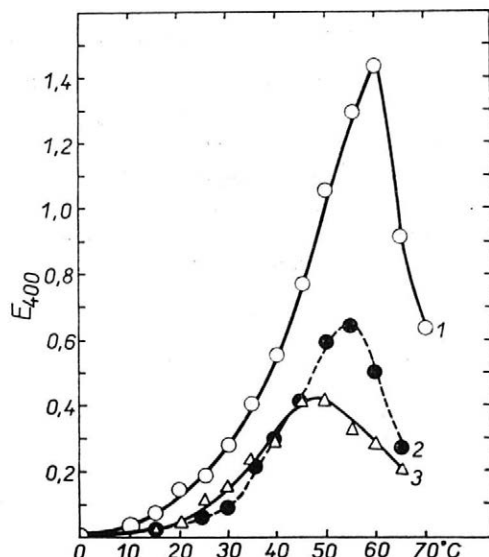


4. Rýchlosť hydrolýzy L-Leu-Nap v závislosti na pH; ako enzým je použité zmesné sérum oviec; zloženie inkubačných zmesí je ako u obr. 3 a popísané v texte

3. Rýchlosť hydrolýzy L-Leu-Nap v závislosti na pH; ako enzým slúžili zmesné séra: I. ošípaných, II. koní, III. oviec, IV. hovädzieho dobytká; zloženie inkubačných zmesí: 0,7 ml 0,05 M TRIS/HCl pufer, 0,2 ml séra a 0,1 ml 10^{-2} M L-Leu-Nap; inkubované 30 minút pri 30 °C



5. Závislosť aktivity enzýmu na koncentrácii L-Leu-Nap; ako enzým je použité zmesné kravské sérum; 1 ml inkubačnej zmesi obsahuje 0,2 ml séra, 0,7 ml TRIS/HCl pufru pH 7,5 a substrát o koncentrácii uvedenej v texte; inkubácie sa diala 30 minút pri 30 °C



6. Závislosť aktivity sérovej leucylarylamidázy na inkubačnej teplote; substrát L-Leu-Nap; zloženie inkubačnej zmesi: 0,2 ml séra, 0,7 ml TRIS/HCl pufru pH 7,5 a 0,1 ml 10^{-2} M substrátu; inkubované 30 minút pri udaných teplotách; 1. zmesné sérum oviec, 2. zmesné sérum kráv, 3. zmesné sérum koní

ZÁVISLOSŤ AKTIVITY ENZÝMU NA INKUBAČNEJ TEPLOTE A STABILITA ENZÝMU PRI RÔZNYCH TEPLOTÁCH

Vplyv inkubačnej teploty na aktivitu sérových leucylarylamidáz sa sledoval v rozsahu 0–70 °C. Výsledky na obr. 6 ukazujú, že skúmaný enzým na inkubačnú teplotu nereaguje rovnako. Zatiaľ čo enzým séra oviec za daných podmienok vykazoval maximálnu aktivitu pri 60 °C, u enzýmu séra hovädzieho dobytky a ošipaných sme zaznamenali maximum aktivity pri 55 °C a u leucylarylamidázy konského séra z rozsahu 45–50 °C.

Zároveň sa prešetrila stabilita leucylarylamidáz pri rôznych podmienkach skladovania, a to pri 0 °, 25 ° a 37 °C. Pôvodná aktivita enzýmu sa nemenila pri uchovávaní v chladničke (asi +4 °C) počas piatich dní, pri teplote 25 °C enzým bol stabilný tri dni a pri 37 °C v priebehu dvoch dní. Avšak aj pri dlhšom skladovaní séra nedochádza k podstatnému zníženiu enzymatickej aktivity.

I. Hodnoty K_M pre sérové leucylarylamidázy rôznych zvierat – použitý substrát L-Leu-NAP

Sérové leucylarylamidázy	K_M moly/liter
Prasa ($n = 32$)	$8,3 \cdot 10^{-4}$
Krava ($n = 30$)	$5,5 \cdot 10^{-4}$
Kôň ($n = 15$)	$5,9 \cdot 10^{-4}$
Ovca ($n = 21$)	$2,8 \cdot 10^{-4}$

II. Aktivity leucylarylamidáz v krvných sérach domácich zvierat

Sérové leucylarylamidázy	Aktivita (mikromoly/ liter/min.)
Prasa ($n = 32$)	$20,44 \pm 2,39$
Krava ($n = 30$)	$5,55 \pm 1,30$
Kôň ($n = 15$)	$6,02 \pm 1,08$
Ovca ($n = 21$)	$10,44 \pm 1,37$
Človek ($n = 30$)	24,80

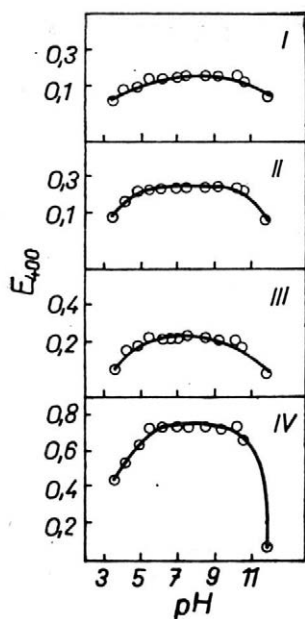
STABILITA SÉROVEJ LEUCYLARYLAMIDÁZY PRI RÔZNYCH pH

Pre štúdium stability enzýmu pri rôznych hodnotách pH sa pufovalo sérum v rozsahu pH 3,5–11,9 univerzálnymi puframi, a to pridaním 4 ml pufru k 1 ml séra. Po 60 minútach stánia v termostate pri 30 °C sa pripravili inkubačné zmesi nasledovným spôsobom: ku 0,85 ml TRIS/HCl pufru o pH 7,5 a 0,1 ml substrátu sa pridalo 0,05 ml pufovaného séra, čím sa dosiahla pre inkubačný roztok požadovaná hodnota asi pH 7,3. Roztoky sa inkubovali štyri hodiny pri 30 °C a zmerala sa ich enzymatická aktivita. Výsledky, znázornené na obr. 7, ukazujú, že sérové leucylarylamidázy boli za uvedených podmienok, t. j. behom 60 minút, inaktivované pri hodnotách nižších ako pH 5,5 a nad pH 10,5.

AKTIVITY SÉROVEJ ARYLAMIDÁZY U ZDRAVÝCH ZVIERAT

Určili sme taktiež aktivity enzýmu v krvných sérach klinicky zdravých zvierat, a to u 21 oviec, 30 kráv, 32 ošipaných, 15 koní a v zmesnom sére ľudí. Získané hodnoty udáva tabuľka II.

DISKUSIA



7. pH stabilita sérovej leucylarylamidázy; substrát L-Leu-NAP; enzým bol vystavený účinku príslušných pufrů 60 minút; zbývajúca aktivita bola stanovená pri pH 7,3 ako je uvedené v texte; I. sérum koní, II. sérum oviec, III. sérum hovädzieho dobytku, IV. sérum ošípaných

štúdiách sa enzymatická aktivita stanovuje totiž v celkovom sére a nie po izolácii enzýmu. Uvedomujeme si tiež, že v danom prípade hydrolyzuje L-Leu-NAP nie iba jeden enzým, ale komplex príbuzných enzýmov, ktorá skutočnosť sa rozvedie aj v ďalších prácach.

Literatúra

- BARTÍK M., BLAHOVEC J., 1971, Arylamidázová aktivita v pečeni a ľadvinách hovädzieho dobytku — rozdelenie aktivity v subcelulárnych frakciách. *Vet. Med. (Praha)* 2 : 91-98.
- BEHAL F. a kol., 1964, A study of the activity of human plasma components on dipeptides and chromogenic substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 108 : 207.
- BLAHOVEC J., BLAHOVCOVÁ K., BARTÍK M., 1971, Arylamidázová aktivita v niektorých orgánoch kurčiat. *Vet. Med. (Praha)* 5 : 319-327.
- DARCEL C., 1969, Alteration of Electrophoretic Pattern of Plasma Aminopeptidase in Avian Erythroblastosis. *Poultry Science* 48 : 1242.
- FLEISHER G. A., PANKOW M., WARMKA C., 1964, Leucine aminopeptidase in human serum: Comparison of hydrolysis of L-leucylglycyl-L-leucyl-L-naphthylamide. *Clin. Chim. Acta* 9 : 259.
- GOMORI G., 1964, Chromatogenic Substrates for Aminopeptidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 87 : 559.

Enzymaticko-kinetické vlastnosti sérovej aminopeptidázy, hydrolyzujúcej L-Leu-NAP u domácich zvierat zatiaľ neboli študované. Pokiaľ boli prevedené niektoré experimenty určujúce podobné charakteristiky uvedeného enzýmu v prípade krvných sér králikov a ľudí, dosiahli sa výsledky zhodné s našimi (Rybák a kol. 1966, Willig a kol. 1967).

Pri sledovaní závislosti hydrolýzy L-Leu-NAP na pH sérovou arylamidázou ľudí a králikov Rybák a kol. (1966) zaznamenali maximálnu aktivitu v rozmedzí pH 7,5—7,7. Podobné údaje získal s krvným sérom ľudí aj Willig a kol. (1967), ktorý použil pri svojich experimentoch TRIS-pufre a fosfátové pufre. pH optimum pre arylamidázu ľudského séra stanovil medzi pH 7,2—7,5, pričom hydrolýza v TRIS-pufroch prebiehala rýchlejšie. Ak sa použili ako substráty β -naftylamidy aminokyselín a keď za zdroj enzýmu boli zvolené krvné séra ľudí, maximálna aktivita arylamidáz bola zistená v rozsahu pH o 6,0—7,5 (Fleisher a kol. 1964).

Štúdium stability sérovej arylamidázy pri 50 °C poukazuje na termostabilnú povahu enzýmu, čo potvrdili aj Kenný a kol. (1968) v prípade arylamidáz krysích ľadvín.

Sme si vedomí nedostatkov, ktoré vo výsledkoch vznikajú, ak sa pri kinetických štúdiách použije nepufrikovaných enzýmov, ako je to v našom prípade. Domnievame sa však, že pre potreby enzymatickej diagnostiky, ktorý cieľ sledujeme, je daný spôsob experimentov dostačujúci a potrebný. Pri klinických

- KENNY A. J., YEE LING WONG-LEUNG, INGRAM J., 1968, A Comparison of Enzymes in Rat Kidney that Hydrolyse L-Leucinamid, L-Leucyl-p-Nitroanilide and ^{125}J -Iodinated Insulin B. Chain. *Biochem. J.* 110 : (390) 6 P.
- LETTOW E., JAEGER CH., 1963, Die Leucin-Aminopeptidase Aktivität im Serum klinisch gesunder Hunde. *Tierärztliche Umschau* 18 : 294.
- LETTOW E., JAEGER CH., 1965, Bestimmung der Leucin-Aminopeptidase-Aktivität im Serum trächtiger Hündinnen. *Zentralblatt für Vet. Med.* 12 : 368.
- MALINOWSKA A., 1965, The activity of L-leucine aminopeptidase (LAP) in blood of healthy and tuberculosis infected cattle. *Polskie Arch. Wet.* 9 : 135.
- MALINOWSKA A., TOMICKY Z., 1965, Aktywność L-leucylo-aminopeptidazy w surowicy koni zdrowych. *Polskie Arch. Wet.* 9 : 156.
- NACHLAS M., GOLDSTEIN T. P., SELINGMAN A. M., 1962, An Evaluation of Aminopeptidase Specificity with Seven Chromogenic Substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 97 : 223.
- PATTERSON E. K., HSIAO S. H., KEPPEL A., 1963, Studies on dipeptidases and aminopeptidases. I. Distinction between leucine aminopeptidase and enzymes that hydrolyse L-leucyl-naphthylamide. *J. Biol. Chem.* 238 : 3611.
- PATTERSON E. K., HSIAO S. H., KEPPEL A., SOROF S., 1965, Studies on dipeptidases and aminopeptidases. II. Zonal electrophoretic separation of rat liver peptidases. *J. Biol. Chem.* 240 : 710.
- RYBÁK M. a kol., 1966, The breakdown of L-leucyl-p-nitroanilide by serum and tissue homogenates. *Physiologia Bohemoslovaca* 15 : 276.
- RYBÁK M. a kol., 1967, Cleavage of glycine, alanine and leucine-p-nitroanilides by some animal arylaminopeptidases. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* 32 : 1051.
- ŠLESINGER L., 1965, Zu der Enzymaktivitäten der Glutamatooxalacetat und Glutamatspyruvat-Transaminase, der Aldolase, Leuzylaminopeptidase, der Laktiko und Maliko-Dehydrogenase bei der Grippe-Bronchopneumonie der Schweine. *Monatshefte für Vet. Med.* 20 : 573.
- ŠLESINGER L., 1966a, Untersuchungen über die Aktivität der Leuzylaminopeptidasen im Blutserum einiger Haustiere. *Monatshefte für Vet. Med.* 21 : 778.
- ŠLESINGER L., 1966b, Leucinaminopeptidase-Aktivität im Blutserum gesunder Hühner. *Wien. Tierärztl. Monatsschrift* 53 : 931.
- TUPPY H., WIESBAUER U., WINTERSBERGER E., 1962, Aminosäure-p-nitroanilide als Substrate für Aminopeptidasen und andere proteolytische Fermente. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 329 : 278.
- WILLIG F., GREINER I., STORK H., SCHMIDT F. H., 1967, Leucinaminopeptidase (Arylamidase) Aktivität im Serum Bestimmung mit Leucin-p-nitroanilid als Substrat. *Klinische Wochenschrift* 45 : 474.
- , 1961, *Biochemists' Handbook*. Edited by Cyril Long E. & F. N. Spon, London : 41.

Došlo dne 21. 8. 1970

БАРТИК М., МИХНОВА Э. (Ветеринарный институт, кафедра химии, биохимии и токсикологии, Кошице, Чехословакия). Ариламидазная активность в сыворотках крови домашних животных. *Вет. Мед. (Прага)* 16 (7) : 449-456, 1971.

Определяли нормальную активность ферментов, гидролизующих Л-лейцил-п-нитроанилид (лейцилариламидазу) в сыворотках крови домашних животных. Были проведены также некоторые кинетические исследования. Активность сывороточной лейцилариламидазы у взрослых здоровых животных обладает следующими величинами: коровы ($n = 21$) $10,44 \pm 1,37$; лошади ($n = 15$) $6,0 \pm 1,08$; свиньи ($n = 32$) $20,4 \pm 2,39$ микромоли п-нитроанилина. Энзиматическая активность выражена количеством свободного п-нитроанилина в микромолях на 1000 мл сыворотки за минуту при 30°C . pH-оптимум действия фермента в TRIS/HCl буферах = 7,5. Лейцилариламидазы инактивируются в течение 60 мин. и 30°C при pH менее 5,5 и более 10,0. Первоначальная активность ферментов при 4°C в течение 5 дней хранения осталась без изменений, при 25°C фермент был стабильным в продолжение 3 дней, а при 37°C — в течение 2 дней. Величины K_m для Л-лейцил-п-нитроанилида и лейцилариламидазы в сыворотке коров, лошадей, овец и свиней составили: $5,5 \cdot 10^{-4}$; $59 \cdot 10^{-4}$; $2,8 \cdot 10^{-4}$; $8,3 \cdot 10^{-4}$ Моль/литр. Эти данные относятся к неспорченным ферментам.

ариламидазные ферменты; сыворотка крови; корова; лошадь; овца; свинья

BARTÍK M., MICHNOVÁ E. (University of Veterinary Medicine, Dept. of Chemistry, Biochemistry and Toxicology, Košice, Czechoslovakia). *Arylamidase Activity in Blood Sera of Farm Animals*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 449-456, 1971.

Normal activities of the L-leucyl-p-nitroanilid hydrolysing enzymes were determined in blood sera of farm animals. Some kinetic studies were carried out, too. The activities of serum leucylarylamidase in adult healthy animals have the following values: cows (n = 30) $5,55 \pm 1,30$; sheep (n = 21) $10,44 \pm 1,37$; horses (n = 15) $6,02 \pm 1,08$; pigs (n = 32) $20,44 \pm 2,39$ micromols of p-nitroaniline. Enzyme activity is expressed by the amount of released p-nitroaniline in micromols per 1000 ml serum in a minute at 30 °C. The pH optimum of the enzyme effect in TRIS/HCl buffers is 7,5. Leucylarylamidases are inactivated within 60 minutes and 30 °C with a pH lower than 5,5 and higher than 10,0. The original enzyme activity in the serum did not change when kept in a refrigerator at 4 °C for 5 days, at a temperature of 25 °C the enzyme was stable for 3 days and at 37 °C within two days. The K_M values for L-leucyl-p-nitroanilid and leucylarylamidase of the cow-, horse-, sheep- and pig-serum amount to: $5,5 \cdot 10^{-4}$; $5,9 \cdot 10^{-4}$; $8,3 \cdot 10^{-4}$ Mol/liter. The data relate to unpurified enzymes.

arylamidase enzymes; blood serum; cow; horse; sheep; pig

BARTÍK M., MICHNOVÁ E. (Hochschule für Veterinärmedizin, Lehrstuhl für Chemie, Biochemie und Toxikologie, Košice, Tschechoslowakei). *Die Arylamidasenaktivität im Blutserum der Haustiere*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 449-456, 1971.

Es wurden die normalen, das L-Leucyl-p-Nitroanilid (Leucylarylamidase) im Blutserum der Haustiere hydrolysierenden Enzymaktivitäten ermittelt. Es sind auch einige kinetischen Studien durchgeführt worden. Aktivitäten der Serumleucylarylamidase bei erwachsenen gesunden Tieren haben die folgenden Werte: Kühe (n = 30) $5,55 \pm 1,30$; Schafe (n = 21) $10,44 \pm 1,37$; Pferde (n = 15) $6,02 \pm 1,08$; Schweine (n = 32) $20,44 \pm 2,39$ Mikromole des p-Nitroanilins. Die enzymatische Aktivität ist mit der Menge des ausgelösten P-Nitroanilins in Mikromolen auf 1000 ml Serum per Minute bei 30 °C ausgedrückt. Das pH-Optimum der Enzymwirkung in TRIS/HCl Puffern ist 7,5. Leucylarylamidasen werden innerhalb der 60 Minuten und 30 °C bei einem pH niedriger als 5,5 und höher als pH 10 inaktiviert. Die ursprüngliche Enzymaktivität im Serum änderte sich nicht bei einer Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4 °C für die Zeit von 5 Tagen, bei einer Temperatur 25 °C war das Enzym 3 Tage stabil und bei 37 °C im Verlaufe von 2 Tagen. Die K_M -Werte für das L-Leucyl-p-Nitroanilid und Leucylarylamidase des Kuh-, Pferde-, Schafe-, und Schweineserums betragen: $5,5 \cdot 10^{-4}$; $5,9 \cdot 10^{-4}$; $2,8 \cdot 10^{-4}$; $8,3 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter. Die Angaben beziehen sich auf nichtpurifizierte Enzyme.

Arylamidasen-Enzymen; Blutserum; Kuh; Pferd; Schafe; Schwein

Adresa autorů:

Prof. MVDr. M. Bartík, DrSc., MVDr. E. Michnová, Vysoká škola veterinárska, katedra chémie, biochémie a toxikológie, Košice, Komenského 71

VHODNOST NĚKTERÝCH SULFITREDUKČNÍCH MÉDIÍ PRO STANOVENÍ ZÁRODKŮ RODU CLOSTRIDIUM

J. Hanák, S. Konečný

Vysoká škola veterinární, referenční laboratoř I. interní kliniky, Brno
Státní veterinární ústav, Ostrava

HANÁK J., KONEČNÝ S. *Vhodnost některých sulfitredukčních médií pro stanovení zárodků rodu Clostridium*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 457-462, 1971.

V důsledku aktuální potřeby jednoduché, rychlé a poměrně přesné diagnostiky klostridií s eventuální možností stanovit jejich kvantitu v potravinách byla sledována kvantitativní titrace 10 species z rodu *Clostridium* na čtyřech druzích půd a na půdě vlastní modifikace, založených na principu sulfitredukce. Těmto požadavkům nejlépe vyhovuje vlastní modifikace sulfitagaru a Mosse-lův agar, u kterých dochází k dobře ohraničenému růstu intenzívně černých kolonií.

potraviny; klostridia; sulfitredukce; média

Anaerobní sporotvorné zárodky rodu *Clostridium* jsou považovány v hygieně potravin za nespécifické původce kažení potravin a otravy z nich. V poslední době se nahromadilo v literatuře mnoho zpráv o vysoké frekvenci výskytu klostridií v potravinách a o jejich vlivu na zdravotní nezávadnost potravin (Sinell a Levetzow 1967a, Coretti a Mügenburg 1968, Nicodemusz a Felix 1960, Konečný a Hanák 1970 aj.).

Přestože vyšetřování na přítomnost klostridií je již asi 40 let součástí bakteriologického vyšetřování potravin, nejsou média ani metodiky pro kultivaci a izolaci klostridií ustáleny. Při důkazu anaerobních sporotvorných zárodků rodu *Clostridium* se úspěšně využívá jejich schopnosti redukovat sulfit. Podle Terplana a kol. 1967 (cit. Levetzow 1967) je 96 % všech klostridií schopno sulfitredukce. Četná sulfitredukční média, pracující na principu Wilsonem a Blairem propracované sulfitredukce, mají jednu společnou bázi. Ke vhodné živné půdě se přidá sulfit v množství 0,05 % a sloučenina trojmocného železa s vysokou disociační konstantou (citrát železitý nebo síran železitoamonný) v koncentraci 0,05 %. Tyto koncentrace zaručují dokonalé černání půdy za nepatrného inhibičního vlivu na růst klostridií (Sinell a Levetzow 1967b, Levetzow 1967, Mossel 1959). Klostridia přitom redukují sulfit za tvorby nepatrného množství H_2S , který reaguje s přítomným železem na siřník železa, zbavující okolí rostoucích kolonií na černo. Avšak i některé nesporeující, zejména gramnegativní mikroorganismy — *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus* — mají rovněž schopnost redukovat sulfit (Narayan 1967, Zaadhof a Terplan 1967). Tyto zárodky však lze částečně vyloučit zahrátím naočkované půdy na 80 °C po 10 minut nebo účinněji přidáním inhibičních látek k živnému mediu. Za vhodné inhibiční látky jsou považovány krystalviolet, kyselina sorbinová, natrium azid, streptomycin, Polymyxin B, neomycin (Sinell a Levetzow 1967b).

Jak uvádí Zahradnický a kol. (1967), pro zahájení růstu klostridií je potřebný redox-potenciál -200 mV, který je rovněž závislý na pH půdy (např. u *Cl. perfringens* je při pH 7,5 redox-potenciál 40 mV, ale při pH 6,4 -160 mV). Proto se pH půd pro kultivaci anaerobů má upravovat na 6,5 až 0,7. Potřebných redukčních podmínek se také snadno dosáhne tím, že se sníží plocha povrchu média vystaveného vzduchu v poměru k objemu média; rovněž je nutné před naočkováním zbavit půdu vzduchu povařením (regenerace půdy — Zahradnický a kol. 1967). Lze také přidávat redukující cukr (glukóza 0,2–1,0 %) nebo redukční látky s thiolovou skupinou (cystein hydrochlorid 0,01–0,1 %, natrium thioglykolát 0,01–0,1 %). Je třeba si však uvědomit, že vyšší obsah redukčních látek obsahujících thiol může mít při sterilizaci teplem inhibiční účinek na klostridia. Další redukční látky jsou hematin, kyselina askorbová v 0,01–0,1 %, DPN, TPN aj. Půda musí také kromě všech nutričních složek a stimulatorů růstu obsahovat především energeticky účinné látky (sacharidy, aminokyseliny). Proto se užívají půdy enzymové (pepsinové, trypsinové), přidávají se hydrolyzáty masa nebo jiných bílkovin, kvasničný extrakt apod.

MATERIÁL A METODY

Kvantitativní titrace byla dělána na čtyřech druzích sulfitredukčních půd a na půdě vlastní modifikace. Jednalo se o tato média:

1. francouzský sulfitagar (Coretti a Mügenburg 1968),
2. DRCM — Differential Reinford Clostridial Medium (Gibbs a Freeman 1965),
3. Wilson-Blair agar (Zaadhof a Terplan 1967),
4. Mosselův agar (Mossel 1959).

Tyto půdy (č. 1–4) byly námi modifikovány do diagnostické půdy následujícího složení:

pepton (trypton)	10,0
masový extrakt	3,0
kvasničný extrakt	7,0
NaCl	5,0
Cystein hydrochlorid	0,3
Acidum ascorbicum	0,1
agar	20,0
Aqua destilata	1000,0

Před použitím je nutné přidat 10 ml 5% citrátu železitého a 10 ml 5% Na_2SO_4 a pH upravit na 7,0.

Každá půda byla rozlita ve vysokých vrstvách do zkumavek tak, aby jednotlivé druhy sledovaného kmene anaerobních zárodků byly inokulovány v pěti až deseti zředěních, aerobní zárodky v jednom až dvou zředěních té či oné půdy.

Vhodnost uvedených médií jsme prověřovali sledováním růstu čistých bujónových kultur těchto klostridiálních kmenů: *Cl. bifermentans* 1/46, *Cl. botulinum* 21/52, *Cl. perfringens* 48/55, *Cl. perfringens* 52/55, *Cl. sporogenes* 14/49, *Cl. tetani* 6/46 (původ — čs. státní sbírka kultur, Praha), *Cl. tetani* 3/69, *Cl. novyi* 4/68, *Cl. septicum* 2/69, *Cl. histolyticum* 1/69 (KHS Ostrava). Paralelně jsme sledovali bakteriální kmeny: *Salmonella chol. suis*, var. *Kunzendorf* A 9583, *E. coli* A 9080, *Proteus mirabilis* A 4820, *Aeromonas punctata* 14/69, *Streptococcus dysgalactiae* 7/68, *Staphylococcus pyogenes aureus* P 7735 (SVÚ Ostra-

va), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (SVÚ Brno), *B. subtilis* 317, *B. cereus* B 34, *B. cereus*, var. *mycoides* 241, *B. megaterium* 237, *B. mezentericus* 223, *B. cylindrosporus* 203, *B. pumilus* 197 (SVÚ Gottwaldov) a *Listeria monocytogenes* T 318 (SVÚ Opava). Před vlastní inokulací do médií byla sledována čistota kmenů mikroskopickým vyšetřením.

Bakteriální kmeny vyrostlé v bujónové kultuře byly odebrány pasteurovou pipetkou a inokulovány odděleně tak, že vztlínavostí nasátá pipetka byla postupně namáčena ke dnu pěti až deseti zkumavek jednotlivých médií, ztekucených zahřátím a zchlazených na 40 °C. Takto naočkované půdy byly inkubovány v termostatu při 37 °C a denně byla sledována intenzita růstu zárodků, charakter černání půdy a tvorba plynu se segmentací půdy. Orientačně jsme vyšetřovali uměle infikované potraviny zárodky rodu *Clostridium* inokulací 1–2 g homogenizované potraviny do média.

VÝSLEDKY

Vhodnost vyšetřovaných médií pro růst zárodků rodu *Clostridium* se nám jevila takto:

1. **Francouzský sulfitaagar** — u všech kmenů klostridií docházelo k intenzivní tvorbě plynu, projevující se silnou segmentací půdy, která nejen že znemožňovala dokonale odečítat jednotlivé kolonie, ale znemožňovala také sulfitredukcí; to znamená, že intenzita černání okolí kolonií nedosahovala požadované kvality v důsledku přístupu vzduchu mezi segmenty půdy. Trhání souvislého sloupce média způsobovaly i některé aerobní zárodky, především *Proteus* a *E. coli*.

2. **DRCM** — toto médium umožňovalo klostridiím i některým aerobním zárodkům dokonalou sulfitredukcí, která se projevovala u většiny kmenů difúzním zčernáním celého sloupce půdy již po 24 hodinách inkubace. Nevýhoda proto spočívala především v tom, že nebylo možné kvantitativně stanovit sulfitredukcující zárodky, popřípadě je izolovat. Rovněž toto médium bylo silně rozsegmentováno tvořícím se plynem. Difúzní černání celého sloupce média způsobovaly kromě zárodků *Proteus* a *E. coli* i zárodky *Salmonella chol. suis*.

3. **Wilson-Blairova půda** — růst a sulfitredukční aktivita zárodků byla poměrně slabá, což se projevovalo především nedokonalým černáním kolonií. Kolonie byly bílé, okolí mělo kouřově šedý nádech. Černání nebylo výrazné ani u tak aktivních kmenů, jako je *Cl. bif fermentans* a *Cl. perfringens*. Na druhé straně však bylo silné zkapalňování a segmentace půdy u všech kmenů klostridií.

4. **Mosselův agar** — tato půda se jevila jako velmi vhodná pro kultivaci a kvantitativní stanovení klostridií, které většinou již po 24hodinové inkubaci tvořily jasně zřetelné, černé a izolované kolonie. Pouze u kmene *Cl. botulinum* byly kolonie zřetelné až po 72 hodinách inkubace, u kmene *Cl. novyi* dokonce až po 96 hodinách inkubace. U všech kmenů klostridií docházelo jen k nepatrné segmentaci a zkapalňování půdy, což umožňovalo snadnou odečitatelnost narostlých kolonií. Počet odečitatelných kolonií se pohyboval mezi 5 až 15 koloniemi v celém sloupci média. Při nižších zředěních docházelo v místech, ve kterých byla masivní inokulace sledovaného kmene, po 24 hodinách k difúznímu zčernání půdy. U většiny aktivních kmenů klostridií docházelo však také již po 48 hodinách inkubace k difúznímu černání i ve vyšších ředěních. Šednutím až černáním půdy se projevoval i růst některých aerobních zárodků. Před-

vším zárodky rodu *Proteus*, ale i rodu *Salmonella* a *Aeromonas* způsobovaly po 24 hodinách inkubace v půdě šednutí, jehož intenzita se zvyšovala směrem k horní plošce média, vystavené vzduchu. Po 48 až 72 hodinách nastalo i zde černání, které převážně zasahovalo jen povrchové vrstvy média ve formě černého prstence o síle asi 3 cm.

5. Sulfitagar vlastní modifikace — tato půda se jevila rovněž jako velmi vhodná pro kvantitativní stanovení klostridií. Po 24 hodinách inkubace se projevoval růst většiny klostridií jasně zřetelnými černými koloniemi takřka ve všech ředěních, takže bylo možné odečítat až 90 kolonií ve sloupci půdy. Zárodky *Cl. bifermentans* a *Cl. sporogenes* rostly v této době ve větších koloniích, dosahujících až velikosti zrnka prosa. Difúzní černání nastupovalo až po 48 hodinách, a to jen ve velmi nízkých ředěních (kolem 50 kolonií v půdě). Ve vyšších ředěních (5—10) byly kolonie odečitatelné i po třetím dnu inkubace. Růst zárodků *Cl. histolyticum* a *Cl. septicum* byl zřetelný většinou až po 48 hodinách inkubace — zárodky rostly ve velmi drobných, zřetelně ohraničených černých koloniích i v nižších ředěních. Zárodky *Cl. botulinum* a *Cl. novyi* byly viditelné až po 48 až 72 hodinách inkubace. Segmentace a ztekucování půdy bylo velmi nepatrné a jen u velice aktivních kmenů, jako je *Cl. perfringens* a *Cl. bifermentans*. Také v těchto případech si zachovávaly kolonie svůj ohraničený charakter i po 48 hodinách. Růst aerobních zárodků byl obdobný jako v Mosselově agaru.

DISKUSE

V souhlase s jinými autory (Sinell a Levetzow 1967a, Coretti a Mügenburg 1968, Mossel 1959) se nám jeví půdy pracující na principu sulfitredukce jako vhodné ke kvantitativnímu stanovení klostridií. I když základní substance, umožňující černání (trojmocné železo v organické sloučenině a natrium sulfit), jsou kvantitativně shodné (mimo Wilson-Blairovu půdu) a zaručují tím optimální barevnou reakci za nepatrného inhibičního vlivu na růst klostridií, je stejně nutné, aby i ostatní živné a tmelící báze byly v takovém poměru, který by podporoval růst i velmi náročných kmenů klostridií v ohraničených koloniích, a tím i snadné stanovení počtu. V tomto směru se nám nejméně osvědčoval francouzský agar a DRCM. V důsledku menší „tvrdosti“ a především vyššího obsahu cukru docházelo k silné segmentaci těchto médií. Rovněž vyšší obsah redukčních látek (cystein, cukr), hlavně u DRCM, stimuloval sulfitredukční aktivitu klostridií do té míry, že docházelo velmi rychle k intenzivnímu difúznímu černání celého sloupce média, což samozřejmě zabraňovalo kvantitativnímu stanovení klostridií.

Na rozdíl od uvedených médií se jevil Mosselův agar jako nejvhodnější. Docházelo jen k velmi slabé segmentaci půdy, růst klostridií byl ve většině případů do 24 hodin dobře ohraničený v intenzivně černých koloniích. Ve vyšších ředěních byly v této době odečitatelné kolonie většinou v počtu 5 až 10 kolonií. Po 48 hodinách však docházelo již k difúznímu černání celého sloupce. Podobný závěr uvádí i Sinell a Levetzow (1967b), Mossel (1959) a další.

V naší modifikaci sulfitagaru jsme přidavkem 20 % agaru zajistili dostatečnou tvrdost média, a tím také omezili segmentaci půdy na nejnižší míru. Rovněž jsme postupně upravili i přidavek redukčních látek na taková množství, při kterých byl umožněn růst ohraničených kolonií klostridií, podobně jako v Mos-

selově agaru. Na rozdíl od Mosselovy půdy byla však nejlepší odečitelnost vyrostlých kolonií až po 48 až 72 hodinách inkubace (u *Cl. botulinum* a *Cl. novyi* ještě později), kdy bylo možné odečítat kolonie i v nižších ředěních v počtu 60 až 90 kolonií bez vzniku difúzního černání. Tento faktor byl obzvláště příznivý po kultivaci vysoce aktivních kmenů (*Cl. bifermentans*, *Cl. perfringens*). K difúznímu černání docházelo většinou teprve po delší expozici.

Na rozdíl od posledních dvou uváděných médií se nám neosvědčilo použití Wilson-Blairovy půdy, na které růst klostridií nebyl jednoznačně průkazný a která nezaručovala ani základní reakci sulfitredukčního média — černání.

Žádný ze sledovaných aerobních sporogenních zárodků rodu *Bacillus* se neprojevoval barevnými změnami půdy, což je závažný moment zvláště při vyšetřování potravin, ve kterých jsou tyto zárodky velmi častou kontaminantou, tím spíše, že odolnost jejich spor vůči vyšším teplotám bývá často větší než u klostridií.

V souhlase s Narayanem (1967), Zaadhofem a Terplanem (1967) a dalšími autory jsme prokázali sulfitredukční schopnost i u zárodků rodu *Salmonella*, *Proteus* a *Aeromonas*. Sulfitredukční vlastnosti měl podle našich výsledků i kmen *E. coli* A 9080. Charakter černání, způsobený těmito kmeny, byl však odlišný od růstu klostridií a soustřeďoval se především na horní vrstvy média.

Za přečtení rukopisu a cenné připomínky děkujeme prof. dr. Černému, řediteli SVÚ Ostrava dr. Sedláčkovi a dr. B. Štěpánkovi, za technickou spolupráci pak E. Černé a E. Soldánové.

Literatura

- CORETTI K., MÜGENBURG H., 1968, Vorkommen und Bedeutung von Clostridien in Gelatine. Die Fleischwirtschaft 5 : 632-637.
- GIBBS X., FREAME X., 1965, Methods for the recovery of clostridia from foods. J. appl. Bact. 28 : 95.
- KONEČNÝ S., HANÁK J., 1970, Problematika výskytu klostridií v potravinách. Výhled veterinárních hygieniků a dietetiků 1, díl II.
- MOSSEL A. A., 1959, Enumeration of sulfite-reducing clostridia occurring in foods. J. Sci. Food Agric. 10 : 662-664.
- NARAYAN K. G., 1967, Culture isolation and identification of clostridia. Zblt. Bakt. Orig. I., 202/2 : 212-220.
- NICODEMUSZ X., FELIX I., 1960, Über Vorkommen von Clostridien in Lebensmittelprodukten und ihre Rolle bei Lebensmittelschädigungen. Zblt. Bakt. Orig. I., 177 : 403-408.
- LEVETZOW R., 1967, Ein Beitrag zum Clostridiennachweis bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Arch. f. Lebensmittelhygiene 10 : 217-219.
- SINELL J. H., LEVETZOW R., 1967a, Sulfitreduzierende Clostridien in vorverpackten Fleischwaren. Die Fleischwirtschaft 4 : 392.
- SINELL J. H., LEVETZOW R., 1967b, Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Clostridien in Lebensmitteln. Arch. f. Lebensmittelhygiene 4 : 73-74.
- ZAADHOF X., TERPLAN X., 1967, Zur Eignung verschiedener Nährmedien für den Nachweis von Clostridien in Milch. Arch. f. Lebensmittelhygiene 18 : 27-30.
- ZAHRADNICKÝ J., 1967, Mikrobiologické vyšetřovací metody. Obzor, SZN: 307-314.

Došlo dne 10. 8. 1970

ГАНАК Я., КОНЕЧНЫ С. (Ветеринарный институт, Брно; Государственный ветеринарный институт, Острава, Чехословакия). Пригодность некоторых сульфитредукционных типов среды для определения зародышей рода *Clostridium*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 000-000, 1971.

В целях разработки простой, быстрой и сравнительно точной диагностики клостридий и ввиду необходимости их количественного определения в пищевых продуктах изучалось количественное титрование 10 видов рода *Clostridium* на 4 видах почв и на почве собственной модификации, заложенных по принципу сульфитредукции. Этим требованиям лучше всего отвечает собственная модификация сульфитагара и агар Моссела, на которых рост интенсивно черных колоний хорошо выделяется.

пищевые продукты; клостридии; сульфитредукция; среда

HANÁK J., KONEČNÝ S. (University School of Veterinary Medicine, Brno; State Veterinary Institute, Ostrava, Czechoslovakia). *Suitability of Some Sulphite-Reduction Media for the Determination of the Germs of Genus Clostridium*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 457-462, 1971.

As a result of the urgent need for a simple, quick and relatively accurate diagnosis of clostridia and, if required, for the possibility of the determination of their quantity in foodstuffs, trials were made with quantitative titration of 10 species of genus *Clostridium* in four kinds of media and in the authors' own medium modification based on the principle of sulphite-reduction. These requirements are most favourably met in the authors' own modification of sulphite agar and Mossel's agar where well-determined growth of intensively black colonies occurs.

foodstuffs; clostridia; sulphite-reduction; media

HANÁK J., KONEČNÝ S. (Hochschule für Veterinärmedizin, Brno; Staatliches Veterinärinstitut, Ostrava, Tschechoslowakei). *Zweckmäßigkeit einiger Sulphitreduktionsmedien für die Keimbestimmung der Gattung Clostridium*. Vet. Med. (Praha) 16 (7) : 457-462, 1971.

Infolge des aktuellen Bedarfes einer einfachen, schnellen und verhältnismäßig genauen Clostridiendiagnostik und eventueller Möglichkeit der Ermittlung deren Quantität in Lebensmitteln ist die quantitative Titrierung von 10 Arten der Gattung *Clostridium* auf 4 Bodenarten und auf einem Boden einer eigenen Modifikation, die auf dem Prinzip der Sulphitreduktion beruhten, verfolgt worden. Diesen Anforderungen entspricht am besten die eigene Sulphitagarmodifikation und Mossel-Agar, wo zu einem gut begrenzten Wachstum intensiv schwarzer Kolonien kommt.

Lebensmittel; Clostridien; Sulphitreduktion; Medien

Adresy autorů:

MVDr. J. Hanák, Vysoká škola veterinární, referenční laboratoř I. interní kliniky, Brno, MVDr. S. Konečný, Státní veterinární ústav, Ostrava

Rukopis odevzdán k tisku 22. 4. 1971 — Podepsáno k tisku 13. 8. 1971

V čísle 8 časopisu Veterinární medicína budou uveřejněny následující články:

Vlček Z.: Přechod chlortetracyklinu placentou skotu

Bahník Z.: Zhodnocení plodnosti býků při použití krátkodobě konzervovaného a hluboce mraženého spermatu

Rob O., Jiránek E.: Sledování některých spermiologických kritérií hluboce zmraženého spermatu ve formě pelet

Jiránek E., Rob O.: Sledování vakuol v nukleoplazmě býků z čerstvého a hluboce mraženého spermatu

Holý L.: Produkce a kvalita semene býků plemene B. Swiss a Holstein chovaných v subtropických podmínkách Kuby

Holý L.: Meziplenenné a věkové rozdíly v diferenciálním spermiogramu u býků

Práce uveřejněné v tomto čísle časopisu Veterinární medicína jsou věnovány k uctění památky nedožitých 75. narozenin prof. dr. E. Příbyla, DrSc. a byly většinou předneseny na I. Příbylových dnech, konaných na Vysoké škole veterinární v Brně.

V čísle 9 časopisu Veterinární medicína budou uveřejněny následující články:

Žuffa A.: Imunizácia proti Aujeszského chorobe — izolovanie klónu avirulentného pre králiky a morčatá a hodnotenie jeho imunogenity

Renda V., Ryšánek D.: Stabilizace buněčných elementů mléka a reprodukovatelnost elektronického stanovení jejich počtu

Čermák O.: Plodnost býků amerického zebu během tropického roku

Arendarčík J., Halagan J.: Sérový gonadotropín (PMSG) křížencov kobýt malého plemena

Řehulová E., Sýkora I.: Neutrální komplikace po preventivním očkování beagů proti vzteklině

Zapletal O.: Vliv pH prostředí a některých sloučenin kovů na enzymatickou aktivitu rostlinné ureázy

Šimková D., Boďa K.: Obsah tuku u myší po aplikácii autothioglukózy

Sova Z., Koudela K., Trefný D., Vrbenská A., Němec Z., Houška J., Janda J., Pujman V.: Kyselina močová v krevním séru a játrech bažantů obecných (*Phasianus colchicus*) do jednoho roku života

Ryšánek D., Renda V.: Mechanismus reakce Mastitis testu - NK a způsob posuzování jeho pozitivitu	405
Podaný J., Muzikant J., Čanderle J.: Elektrický odpor měřený na vaginální sliznici u gravidních a negravidních prasnic	415
Páv J., Zajíček D.: Sezónní dynamika a epizootologie nematodóz černé zvěře (<i>Sus scrofa</i> L.) v oboře Květov	421
Tománek J.: Experimentální invaze plicivkami <i>Dictyocaulus viviparus</i> u morčat po parenterální aplikaci larev	431
Dobšínská E.: Pohlavní rozdíly v erytrogramu dospělé drůbeže LB a PB v tropických podmínkách	439
Bartík M., Michnová E.: Arylamidázová aktivita v krvných sérech domácích zvířat	449
Hanák J., Konečný S.: Vhodnost některých sulfitredukčních médií pro stanovení zárodků rodu <i>Clostridium</i>	457



СОДЕРЖАНИЕ

Рышаиек Д., Ренда В.: Механизм реакции Мастит-НК теста и способ оценки его положительности	412
Поданы И., Музыкант И., Чандерле Й.: Электросопротивление, замеченное на вагинальной слизи у супоросных и несупоросных свинок	419
Пав И., Заичек Д.: Сезонная динамика и эпизоотология нематодозов диких кабанов (<i>Sus scrofa</i> L.) в заповеднике Кветов	429
Томанек Й.: Экспериментальная инвазия матастронгилеза <i>Dictyocaulus viviparus</i> у морских свинок после парентерального применения личинок	436
Добшинска Э.: Половые различия в эритрограмме взрослой птицы ЛБ и ПБ в тропических условиях	447
Бартик М., Михнова Э.: Ариламидазная активность в сыворотках крови домашних животных	455
Ганак Я., Конечны С.: Пригодность некоторых сульфитредукционных типов среды для определения зародышей рода <i>Clostridium</i>	461

CONTENT

Ryšánek D., Renda V.: Mechanism of the Mastitis Test - NK Reaction and the Method of the Evaluation of its Positivity	412
Podaný J., Muzikant J., Čanderle J.: Electric Resistance Measured on Vaginal Mucous Membrane in Pregnant and Non-Pregnant Sows	420
Páv J., Zajíček D.: Season Dynamics and Epizootology of Wild Boars (<i>Sus scrofa</i> L.) Nematodoses in the Preserve of Květov	429
Tománek J.: The Experimental Invasion of Guinea Pigs with the Cattle Lungworm (<i>Dictyocaulus viviparus</i>) by Parenteral Injections of Larvae	436
Dobšínská E.: Sexual Changes in Erythrogram of Manure WL and WP Poultry in Tropical Conditions	447
Bartík M., Michnová E.: Arylamidase Activity in Blood Sera of Farm Animals	456
Hanák J., Konečný S.: Suitability of Some Sulphite-Reduction Media for the Determination of the Germs of Genus <i>Clostridium</i>	462

INHALT

Ryšánek D., Renda V.: Reaktionsmechanismus des NK-Mastitis-Testes und Beurteilungsart deren Positivität	413
Podaný J., Muzikant J., Čanderle J.: Der auf der Vaginalschleimhaut gravid und nichtgravid Sauen gemessene elektrische Widerstand	420
Páv J., Zajíček D.: Saisondynamik und Epizootologie der Nematodosen des Schwarzwildes (<i>Sus scrofa</i> L.) im Gehege Květov	429
Tománek J.: Experimentelle Invasion durch <i>Dictyocaulus viviparus</i> bei Meerschweinchen nach der parenteralen Larvenapplikation	437
Dobšínská E.: Sexuelle Unterschiede im Erythrogramm erwachsener Hühner der Weißen Leghorn- und Plymouthrasse unter tropischen Bedingungen	448
Bartík M., Michnová E.: Die Arylamidasenaktivität im Blutserum der Haustiere	456
Hanák J., Konečný S.: Zweckmäßigkeit einiger Sulphitreduktionsmedien für die Keimbestimmung der Gattung <i>Clostridium</i>	462

Ryšánek D., Renda V.: Mécanisme de la réaction du test Mastitis - NK et manière d'appréciation de sa positivité	414
Podaný J., Muzikant J., Canderle J.: Résistance électrique mesurée sur la muqueuse vaginale des truies gravides et non gravides (res. An, Al/420)	
Páv J., Zajíček D.: Dynamique saisonnière et épizootologie des nématodes des bêtes noires (<i>Sus scrofa</i> L.) dans le parc à gibier Květov	430
Tománek J.: Invasion expérimentale des cobayes par les strongles <i>Dictyocaulus viviparus</i> à la suite de l'application parentérale des larves (res. An/436, Al/437).	
Dobšínská E.: Différences sexuelles entre l'érythrogramme IB et PB de la volaille adulte dans les conditions tropicales (res An/447, Al/448).	
Bartík M., Michnová E.: Activité de l'arylamidase dans les sérums sanguins des animaux domestiques (res. An, Al/456).	
Hanák J., Konečný S.: Opportunité de certains milieux réduisant les sulfites, pour la détermination des germes du genre <i>Clostridium</i> (res. An, Al/462).	