

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

12

ROČNÍK 27 (LV)

PRAHA

PROSINEC 1982

CENA 10 Kčs

ISSN 0590-5214

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Řídí redakční rada:

prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc. (předseda), akademik Koloman Boďa, doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., prof. MVDr. Ján Elečko, CSc., MVDr. Miloš Halaša, CSc., doc. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., prof. MVDr. Dagmar Ježková, DrSc., MVDr. Evžen Jurák, CSc., prof. MVDr. Ladislav Polák, CSc., MVDr. Josef Straka, CSc., prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., akademik Jaroslav Oto Vrtiak

Za vedení časopisu odpovídá prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc.

Redaktorka ing. Jovanka Václavíková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1982

■

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozbor a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Československá akademie zemědělská — Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství. Vychází měsíčně. Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné Kčs 120,—.

■

Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзоры, анализы и научные статьи о решенных задачах по научному исследованию в области ветеринарии. Издаёт Чехословацкая сельскохозяйственная академия — Институт научно-технической информации по сельскому хозяйству. — Выход в свет ежемесячно. Редакция 120 56 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. Published by the Czechoslovak Academy of Agriculture — Institute of Scientific and Technical Information for Agriculture. Issued monthly. Editorial office 120 56 Prague 2, Slezská 7.

■

Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍNA veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Abhandlungen über die gelösten Forschungsaufgaben auf dem Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben von der Tschechoslowakischen landwirtschaftlichen Akademie — Institut für wissenschaftlich-technische Information der Landwirtschaft. Erscheint monatlich. Redaktion 120 56 Prag 2, Slezská 7.

KONCENTRÁCIA PROGESTERÓNU A TYROXÍNU V LUTEÁLNEJ FÁZE CYKLU JALOVÍC PO OVPLYVNEŇÍ ESTRADIOL BENZOÁTOM

J. Elečko, E. Bekeová, J. Choma, I. Maraček

ELEČKO, J. — BEKEOVÁ, E. — CHOMA, J. — MARAČEK, I. (Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, oddelenie reprodukcie hospodárskych zvierat, Košice): *Koncentrácia progesterónu a tyroxínu v luteálnej fáze cyklu jalovic po ovplyvnení estradiol benzoátom*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 705-714.

Hodnotili sme vplyv priebežnej 48-hodinovej infúzie estradiol benzoátu (EB) na dynamiku koncentrácie progesterónu (P) a tyroxínu (T₄) u štyroch jalovic v luteálnej fáze cyklu. Parametre sme hodnotili v troch intervaloch: v infúznom (A), postinfúznom (B) a „neovplyvnenom“ intervale (C). V priebehu infúzie mali koncentrácie P u troch zvierat výrazne klesajúcu tendenciu. Zvýšená koncentrácia P zistená v 36. hodine infúzie sa udržiavala aj počas postinfúzneho intervalu. Pokles P v trefom „neovplyvnenom“ intervale bol ku koncu opäť vystriedaný jeho výrazným vzostupom. U jednej jalovice došlo na začiatku infúzie EB v koncentráciách P k vzostupu. Pokles sme zaznamenali ku koncu uvedeného intervalu. V postinfúznom intervale koncentrácia P poklesla. Pomerne vysoká koncentrácia P v priebehu „neovplyvňovaného“ intervalu bola ku koncu opäť vystriedaná poklesom v 268. hodine. Koncentrácie T₄ u troch jalovic mali v infúznom i postinfúznom intervale klesajúcu tendenciu. Pokles v priebehu infúzie bol výraznejší. V „neovplyvňovanom“ intervale sa koncentrácie T₄ pozvoľne zvyšovali. U jednej jalovice sa koncentrácia T₄ počas infúzie mierne zvýšila. Pokles sme zaznamenali v postinfúznom i v „neovplyvňovanom“ intervale. Rektálnym vyšetrením v 172. hodine sme u troch zvierat zistili pôvodné žlté telieska a u jednej jalovice sa vytvorilo žlté teliesko na tom istom vaječníku. V 88. hodine sme u tohoto zvieraťa zistili klinické prejavy ruje. Z dynamiky sledovaných hormónov a z klinického pozorovania možno považovať hormóny štítnej žľazy za významný sekundárny faktor participujúci na trvalých cyklických zmenách v reprodukčnom procese.

infúzia; infúzia estradiol benzoátu; koncentrácia tyroxínu; koncentrácia progesterónu

Pravidelnosť pohlavného cyklu je primárnym výsledkom regulačnej činnosti systému hypotalamus-hypofýza-ováriá, pritom sekundárne je závislá od funkčného stavu endokrinného systému organizmu a od podmienok vonkajšieho prostredia. Poznatky domácej i zahraničnej literatúry poukazujú na hormóny štítnej žľazy (tyroxín a trijódtyroxín) ako na významný sekundárny faktor úzko súvisiaci s estrálnym cyklom hospodárskych i laboratórnych zvierat. Pôsobia na úrovni regulácie pohlavného cyklu hypotalamus, adenohipofýza (Bruni a i., 1975; Cidlowski a Muldoon, 1975; Chen a Walfish, 1978; Greeley a Mahesh, 1978; Wang a i., 1980; Smirnovová, 1981) a ovplyvňujú funkcie vaječníkov (Emery a Williams, 1964; Howland a i., 1966; Nesbitt a i., 1967; Freeman a i., 1969;

Leatham, 1972; Channing a i., 1976) i maternice (Gardner a i., 1978).

Cieľom tejto práce bolo sledovať zmeny koncentrácie progesterónu po dlhodobej infúzii estradiol benzoátu, jeho účinok na žlté teliesko podmienený fázou estrálneho cyklu v infúznom intervale a súbežne sledovať koncentráciu tyroxínu v tých istých podmienkach.

MATERIÁL A METÓDY

POKUSNÉ ZVIERATÁ

Do experimentu sme zaradili štyri jalovice slovenského strakatého plemena s priemernou hmotnosťou 330 kg. U zvierat bola opakovaným rektálnym vyšetrením ako aj stanovením hladín progesterónu potvrdená luteálna fáza cyklu. V 172. hodine experimentu sme rektálnym vyšetrením posúdili stav vaječníkov.

APLIKOVANÝ PRÍPRAVOK

Jaloviciam sme kvapkovou infúziou infundovali estradiol benzoát vo forme prípravku Agofollín-Depot v množstve 6,15 mg na zviera po dobu 48 hodín. Estradiol benzoát sme po rozpustení v alkohole a po zriedení vo fyziologickom roztoku infundovali pomocou humánnej infúznej súpravy. Fľašu s infúznym roztokom sme popruhmi upevnili v oblasti kohútika zvierata. Odvodnú hadičku infúznej súpravy, opatrenú priškrčovacím ventilom, sme napojili na kateter zavedený do *v. jugularis*.

ODBERY VZORIEK

Vzorky sme odoberali permanentnými kanylami z *v. jugularis* 48 hodín pred infúziou estradiol benzoátu. Odber krvi robený súbežne so začiatkom infúzie sme označili ako nultý a ďalej sme pokračovali v 6, 10, 12. a 24-hodinových intervaloch v priebehu 13 dní. Vzorky sér boli uložené v jednorazových skúmavkách z plastickej hmoty (Chirana, n. p.) pri teplote -20°C až do spracovania.

STANOVENIE HORMÓNOV

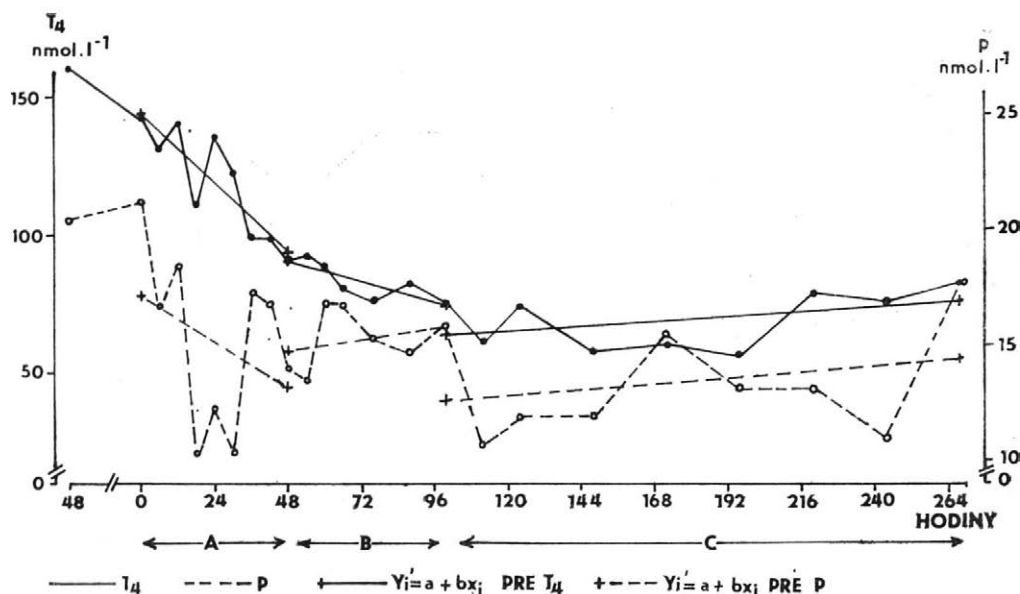
Hladinu progesterónu sme stanovili rádioimunologicky súpravou PROGK fy SORIN. Hladinu T_4 sme stanovili súpravou RIA test — T_4 , dodanou Ústavom rádioekológie a využitia jadrovej techniky v Košiciach.

ŠTATISTICKÉ METÓDY

Mieru rozptylu hodnôt aritmetického priemeru sme určili výpočtom strednej chyby aritmetického priemeru (Červenka, 1975). Priebeh jednotlivých intervalov bol vyrovnaný regresnou funkciou priamky $y_i' = a + b x_i$, kde y_i' sú hladiny hormónov a x_i sú hodnoty času od infúzie estradiol benzoátu. Parametre rovnice priamky boli vypočítané metódou súčtu najmenších štvorcov. Ako mieru tesnosti závislosti sme vypočítali korelačný koeficient r .

VÝSLEDKY

Koncentrácie tyroxínu (T_4) a progesterónu (P) sme hodnotili u štyroch jalovic v luteálnej fáze cyklu v priebehu 48-hodinovej infúzie estradiol benzoátu (EB) a po nej. Po spracovaní a po analýze laboratórnych

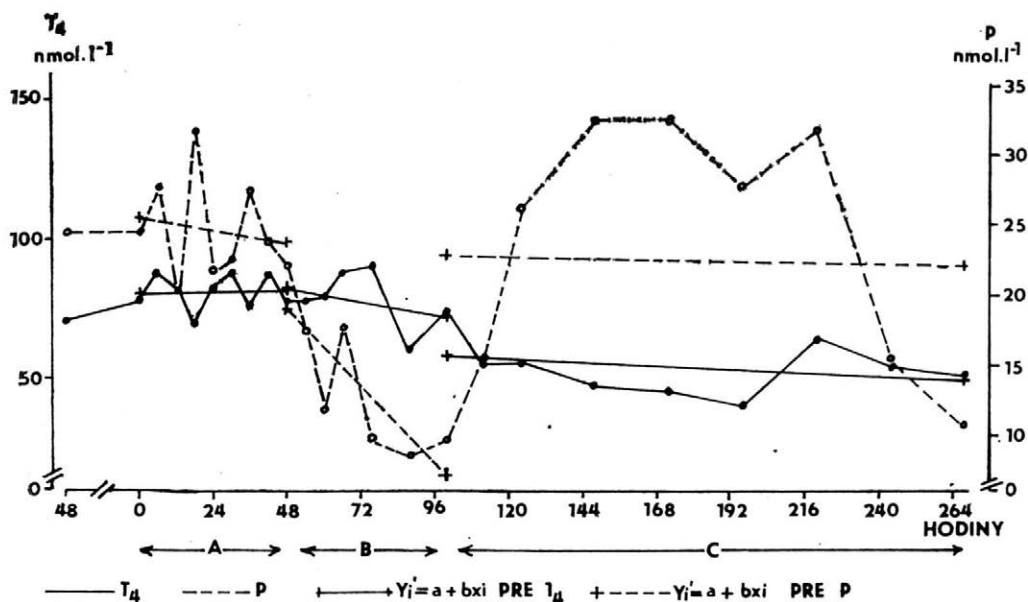


1. Dynamika zmien koncentrácie progesterónu (P) a tyroxínu (T₄) u troch jalovic po infúzii estradiol benzoátu v luteálnej fáze cyklu — The dynamics of changes in the concentration of progesterone (P) and thyroxine (T₄) in three heifers after estradiol benzoate infusion in the luteal stage of the cycle

i klinických výsledkov (individuálne u každého zvieraťa) sme vyhodnotili tri zvieratá (obr. 1, tab. Ia, IIa). Jedno zviera sme hodnotili samostatne (obr. 2, tab. Ib, IIb). Sledované obdobie sme rozčlenili na tri intervaly: infúzia EB (A), postinfúzny interval (B), „neovplyvňovaný“ interval (C). Limitujúcim faktorom pri zatriedovaní zvierat do hodnotenia a pri členení výsledkov na udávané intervaly boli koncentrácie progesterónu v krvnom sére.

I. Priemerná koncentrácia progesterónu (P) a tyroxínu (T₄) u jalovic po infúzii estradiol benzoátu v luteálnej fáze cyklu — The average concentration of progesterone (P) and thyroxine (T₄) in heifers after estradiol benzoate infusion in the luteal stage of the cycle

Zvieraťá	Interval	$\bar{x} \pm mx$	
		P	T ₄
a	A	21,36 $\pm$ 3,07 — 14,01 $\pm$ 0,40	142,97 $\pm$ 15,36 — 91,15 $\pm$ 4,60
	B	14,01 $\pm$ 0,40 — 15,95 $\pm$ 4,36	91,15 $\pm$ 4,60 — 75,24 $\pm$ 1,53
	C	15,95 $\pm$ 4,36 — 17,79 $\pm$ 2,16	75,24 $\pm$ 1,53 — 82,56 $\pm$ 7,40
b	A	24,42 — 22,38	78,0 — 78,0
	B	22,38 — 9,82	78,0 — 74,1
	C	9,82 — 10,84	74,1 — 52,24



2. Dynamika zmien koncentrácie progesterónu (P) a tyroxínu (T₄) u jednej jalovice po infúzii estradiol benzoátu v luteálnej fáze cyklu — Dynamics of changes in the concentration of progesterone (P) and thyroxine (T₄) in one heifer after estradiol benzoate infusion in the luteal stage of the cycle

DYNAMIKA ZMIEN KONCENTRÁCIE PROGESTERÓNU

U troch jalovic sme v priebehu infúzie EB zaznamenali výrazný pokles P s najnižšími hodnotami v 18. ($10,34 \pm 1,51 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) a 30. hodine ($10,22 \pm 1,22 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) sledovania. V 36. hodine, teda ku koncu infúzneho intervalu, sa koncentrácia P u všetkých troch zvierat zvýšila ($17,29 \pm 3,57 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) a na vyšších hladinách sa udržiavala aj počas celého postinfúzneho intervalu. Začiatok tretieho, „neovplyvňovaného“ intervalu je u týchto zvierat charakterizovaný poklesom koncentrácie

II. Hodnoty regresnej funkcie priamky a korelačného koeficientu pre progesterón (P) a tyroxín (T₄) — The values of straight-line regression function and correlation coefficient for progesterone (P) and thyroxine (T₄)

Zvieratá	Interval	$y'_i = a + b x_i$		Korelačný koeficient	
		P	T ₄		
a	A	$17,4020 - 0,0880x_i$	$144,3680 - 1,0420x_i$	-0,3781	-0,8616
	B	$13,7935 + 0,0218x_i$	$105,4894 - 0,3080x_i$	0,3088	-0,8457
	C	$11,5964 + 0,0105x_i$	$56,2932 + 0,0723x_i$	0,2555	0,4182
b	A	$25,6604 - 0,0396x_i$	$80,5344 + 0,0194x_i$	-0,1750	0,0492
	B	$30,0734 - 0,2294x_i$	$91,8814 - 0,1975x_i$	-0,8175	-0,3820
	C	$23,3188 - 0,0044x_i$	$63,9011 - 0,0531x_i$	-0,0281	-0,3140

P. V priebehu uvedeného intervalu sa koncentrácie P opäť zvyšovali a výrazný vzostup ($17,79 \pm 2,16 \text{ nmol.l}^{-1}$) sme zaznamenali na konci tohto intervalu. U jednej jalovice sme na začiatku infúzie B zaznamenali v koncentrácii P mierny vzostup. K nevýraznému poklesu (ako naznačuje regresná funkcia priamky) došlo až ku koncu infúzie EB. Prudký pokles P s najnižšími hladinami v 88. hodine ($8,49 \text{ nmol.l}^{-1}$) sme zaznamenali v priebehu postinfúzneho intervalu. Tretí „neovplyvňovaný“ interval bol u tohoto zvieraťa charakterizovaný vzostupom koncentrácie P a jeho pretrváváním až do 244. hodiny, po ktorej mala koncentrácia P trvale klesajúcu tendenciu s najnižšími hodnotami v 268. hodine ($10,84 \text{ nmol.l}^{-1}$ séra).

DYNAMIKA ZMIEN KONCENTRÁCIE TYROXÍNU

U troch zvierat sme zaznamenali pokles koncentrácie T_4 v priebehu infúzie i v postinfúznom intervale. Pri infúzii bol však pokles výraznejší. V treťom „neovplyvňovanom“ intervale sa koncentrácie T_4 pozvoľne zvyšovali. U jalovice, ktorú sme vyhodnotili samostatne, došlo v priebehu infúzie k miernemu vzostupu koncentrácie T_4 a výraznejší pokles sme zaznamenali v postinfúznom intervale. V „neovplyvňovanom“ intervale mala koncentrácia T_4 naďalej pozvoľne klesajúcu tendenciu.

REKTÁLNY NÁLEZ

U troch zvierat bol rektálny nález v 172. hodine podobný nálezu pred infúziou s potvrdenými pôvodnými žltými telieskami. U samostatne hodnotenej jalovice bola v tejto dobe zistená tvorba nového žltého telieska na tom istom vaječníku. V 88. hodine sme u tohoto zvieraťa pozorovali výrazné klinické prejavy ruje.

DISKUSIA

Dynamika progesterónu a tyroxínu po infúzii estradiol benzoátu poukazuje na skutočnosť, že pôsobenie estrogénov na funkciu žltého telieska je do veľkej miery závislé od dňa luteálnej fázy. Súčasne z dynamiky zmien koncentrácie tyroxínu vyplýva význam tohoto hormónu v uvedenom procese.

Z literárnych údajov [Wiltbank a i., 1961; Kaltenbach a i., 1964; Lemon, 1975] ako aj z našich výsledkov vyplýva, že aplikácia estrogénov kravám a jaloviciam v závislosti od štádia luteálnej fázy cyklu má na žlté teliesko luteotrópny, antiluteotrópny, luteolytický alebo antiluteolytický účinok s následným skrátením alebo predĺžením pohlavného cyklu. Zistenia citovaných autorov sú v súlade so skoršími výsledkami Greensteina a i., (1958), ktorí udávajú, že regresiu žltého telieska u dojnic možno dosiahnuť aplikáciou estradiolu od druhého do 12. dňa estrálneho cyklu, teda na začiatku tvorby, ako aj v rozkvet žltého telieska. Toto obdobie zodpovedá prvej polovici luteálnej fázy. U oviec podanie $17\text{-}\beta$ -estradiolu v rozpätí od 7. do 11. dňa cyklu bolo podľa Waita a Foota (1962, cit. Piper a Foote, 1963) úspešné v navodení ovulácie.

Vychádzajúc zo zistení uvedených autorov ako aj z dynamiky koncentrácie P a T₄ v systémovom obehu a z rektálneho nálezu, ktorý bol u troch zvierat podobný nálezu postinfúznemu, usudzujeme, že u týchto zvierat bol estradiol benzoát infundovaný v druhej polovici luteálnej fázy. U jednej jalovice koncentrácia P a T₄, výrazná ruja a rektálne potvrdená ovulácia svedčí pre aplikáciu estradiol benzoátu v prvej polovici luteálnej fázy.

Hormonálne pomery zvierat v čase infúzie estradiol benzoátu sa môžu podieľať na vyvolaní pozorovaných rozdielov aj v dynamike zmien koncentrácie T₄. Následné zmeny v hladine T₄, ku ktorým došlo po infúzii estradiol benzoátu, mohli byť jedným z významných sekundárnych faktorov vedúcich k pretrvávaniu, resp. k lýze žltého telieska (Free-man a i., 1969). Predĺženie funkčnej životnosti žltého telieska, zaznamenané u troch zvierat po infúzii estradiol benzoátu, je pravdepodobne závislé od momentálnej koncentrácie endogénnych estrogénov a od sekundárnych zmien vyvolaných infundovaným estradiol benzoátom. Z experimentálnych prác, ktoré robili Chen a Walfish (1978) na krysách, je známe, že estradiol benzoát pravdepodobne cez extratyroidálnu konverziu T₄ na T₃ znižuje hladinu T₄. Nízke hladiny T₄ vedú spätne k zvýšeniu produkcie TRH i TSH (De Lean a i., 1977) a k následnej stimulácii sekrécie prolaktínu (Lamming a i., 1974; Diffenbach a i., 1980; Fitzgerald a i., 1981). Zistenia uvedených autorov nepriamo dokazujú, že zvyšovanie hladiny estrogénov v luteálnej fáze cyklu sekundárne stimuluje produkciu prolaktínu, ktorý spolu s LH tvorí u hovädzieho dobytku a oviec tzv. luteotrópny komplex. Experimentálne práce Polana a Behrmana (1981) však dokazujú, že prolaktín (okrem luteotrópného účinku) pri zvýšených hladinách aktivuje v krysách ováriách 5- α reduktázový enzymatický systém, ktorý po interakcii s aromatázovým enzymatickým systémom vyvolá atreziu folikulov priamou inhibíciou syntézy estrogénov alebo sekundárne tým, že redukuje androgény. Redukované androgény nepredstavujú vhodný substrát pre biosyntézu estrogénov (Polan a Behrman, 1981; Hillier, 1981).

Estrogény svojím lokálnym pôsobením senzibilizujú adenylcyklázový systém na pôsobenie FSH, stimulujú proliferáciu folikulárnych buniek granulózy, a tak sa podieľajú na určovaní množstva receptorov pre adenohipofyzárne gonadotrofiny FSH a LH (Hillier, 1981). Nedostatočná syntéza estrogénov môže viesť k zmenám v distribúcii a v počte FSH receptorov s následným zabrzdením proliferácie folikulárnych buniek granulózy a tvorby folikulárnej dutiny. Zníži sa pritom aktivita aromatázového enzymatického systému a tvorba membránových LH receptorov viazaných na bunky théky (Hillier a i., 1980).

Narušením interakcie medzi receptorovým systémom vaječníka a FSH sa dajú vysvetliť aj skoršie názory autorov Piper a Foot (1968), ktorí predpokladali, že k zabrzdeniu ovulácie po aplikácii estrogénov v luteálnej fáze dochádza v dôsledku ich inhibičného pôsobenia na produkciu FSH.

Na snížení produkciu estrogénov po infúzii estradiol benzoátu u troch zvierat v našom experimente poukazuje jednako absencia ovulácie, jednako pozvoľný vzostup T₄ v treťom intervale, ktorý môže byť výsledkom zníženia monodejadacie tohoto hormónu v súvislosti so sekundárnym nedostatkom estrogénov.

U jedného zvierata sme v intervale infúzie zaznamenali mierne zvýšenie koncentrácie T_4 ($y'_i = 80,5344 + 0,0194 x_i$). K najvýraznejšiemu poklesu došlo v postinfúznom intervale ($y'_i = 91,8814 - 0,1975 x_i$). Dynamika hladín T_4 , P klinický nález, ako aj výsledky, ku ktorým dospeli Grosvenor (1962), Galton (1968), Chen a Walfish (1973), poukazujú na vyššie endogénne hladiny estrogénov v druhom intervale. Predpokladáme, že infundovaný estradiol benzoát u tejto jalovice vyvolal pôsobením na adenyl cyklázový systém a folikulárne bunky granulózy zníženie folikulárnych receptorov adenohypofyzárnych gonadotropínov, čím umožnil ďalší vývoj folikulu — zvýšenie estrogénov v druhom intervale — a jeho následnú ovuláciu.

Z porovnania dostupných literárnych údajov s výsledkami nášho pozorovania vyplýva, že estrogény predstavujú činiteľ pôsobiaci na pohlavné orgány jednako priamo, jednako sekundárne cez hypotalamo-hypofyzárny systém, a na zmeny v hladinách hormónov, medzi nimi i štítnej žľazy.

Tyroxín a trijódtyronín sa svojím regulačným pôsobením na metabolické procesy a pravdepodobnou interakciou s pohlavnými steroidmi podieľajú na zabezpečení pravidelných cyklických zmien pohlavných funkcií v reprodukčnom procese.

Literatúra

- BRUNI, J. F. — MARSHALL, S. — DIBBET, J. A. — MEITES, J.: Effects of hyper- and hypothyroidism on serum LH and FSH levels in intact and gonadectomized male and female rats. *Endocrinology*, 97, 1975, s. 558-563.
- CIDLOWSKI, J. A. — MULDOON, T. C.: Modulation by thyroid hormones of cytoplasmic estrogen receptor concentrations in reproductive tissues of the rat. *Endocrinology*, 97, 1975, s. 59-67.
- ČERVENKA, J.: Základy štatistiky. Ed. GORDAN, J. Martin, Osveta 1975, s. 80-93.
- DE LEAN, A. D. — FERLAND, J. — DROUIN, P. — KELLY, A. — LABRIE, F.: Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinology*, 100, 1977, s. 1496-1505.
- DIFFENBACH, W. P. — DENNISON, A. — ROSENBLATT, H. — VAUGHAN, L. — FRANTZ, A. G. — FERIN, M.: Effect of estrogen on thyrotropin — releasing hormone — induced release of prolactin in intact, ovariectomized, and stalk-sectioned female rhesus monkeys. *Endocrinology*, 107, 1980, s. 183-186.
- EMERY, R. S. — WILLIAMS, J. A.: Incidence of ketosis, other diseases, and some postpartum reproductive ailments in normal and triiodothyronine-treated cows. *J. Dairy Sci.*, 47, 1964, s. 879-881.
- FITZGERALD, B. P. — EVINS, J. D. — CUNNINGHAM, F. J.: Effect of TRH on the secretion of prolactin in ewes at various stages of pregnancy and in non-pregnant ewes during the breeding seasonal anoestrus. *J. Reprod. Fert.*, 61, 1981, s. 149-155.
- FREEMAN, M. E. — LEWIS, P. E. — LOUW, G. N. — BUTCHER, R. L. — INSKEEP, E. K.: Thyroid status and life span of the *corpus luteum* in the ewe and rat. *J. Anim. Sci.*, 29, 1969, s. 479-482.
- GALTON, V. A.: Thyroxine metabolism and thyroid function in the pregnant rat. *Endocrinology*, 82, 1968, s. 282-290.
- GARDNER, M. R. — KIRKLAND, J. L. — IRELAND, J. S. — STANCEL, G. M.: Regulation of the uterine response to estrogen by thyroid hormone. *Endocrinology*, 103, 1978, s. 1164-1172.
- GREELEY, G. H. — MAHESH, V. B.: Triiodothyronine (T_3) modulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Endocrin. res. commun.*, 5, 1978, s. 135-159.

GREENSTEIN, J. S. — MURRAY, R. W. — FOLEY, R. C.: Effects of exogenous hormones on the reproductive processes of the cycling dairy heifer. J. Dairy Sci., 41, 1958, s. 1834.

GROSWENOR, C. E.: Effects of estrogen upon thyroidal ^{131}I -J release and excretion of thyroxine in ovariectomized rats. Endocrinology, 70, 1962, s. 673-678.

HILLIER, S. G.: Regulation of follicular oestrogen biosynthesis a survey of current concepts. J. Endocr., 89, 1981, s. 3-18.

HILLIER, S. G. — ZELEZNIK, A. J. — KNAZEK, R. A. — ROSS, G. T.: Hormonal regulation of preovulatory follicle maturation in the rat. J. Reprod. Fert., 60, 1980, s. 219-229.

HOWLAND, B. E. — BELLOW, R. A. — POPE, A. L. — CASIDA, L. E.: Ovarian activity in ewes treated with glucose and triiodothyronine. J. Anim. Sci., 25, 1966, s. 836-838.

CHANNING, C. — TSAI, V. — SACHS, D.: Role of insulin, thyroxine and cortisol in luteinization of porcine granulosa cells grown in chemically defined media. Biol. Reprod., 15, 1976, s. 235-247.

CHEN, H. J. — WALFISH, P. G.: Effects of estradiol benzoate on thyroid-pituitary function in female rats. Endocrinology, 103, 1978, s. 1023-1030.

KALTENBACH, C. C. — NISWENDER, G. P. — ZIMMERMAN, D. R. — WILTBANK, J. N.: Alteration of ovarian activity in cycling, pregnant and hysterectomized heifers with exogenous estrogens. J. Anim. Sci., 23, 1964, s. 995-1001.

LAMMING, G. E. — MOSELEY, S. R. — Mc NEILLY, J. R.: Prolactin release in sheep. J. Reprod. Fert., 40, 1974, s. 151-168.

LEATHAM, J.: Role of the thyroid. In: Reproductive biology. Ed. H. BALLIN — S. GLASSER. Excerpta Medica, Amsterdam, 1972, s. 857-876.

LEMON, M.: The effect of oestrogens alone or in association with progestagens on the formation and regression of the *corpus luteum* of the cyclic cow. Annls Biol. anim. Biochim. Biophys., 15, 1975, s. 243-253.

NESBITT, R. E. L. — ABDUL-KARIM, R. W. — PRIOR, J. T. — SHELLEY, T. F. — ROURKE, J. E.: Study of the effect of experimentally induced endocrine insults upon pregnant and nonpregnant ewes. III. ACTH and propylthiouracil administration and the production of polycystic ovaries. Fertil. Steril., 18, 1967, s. 739-747.

PIPER, E. L. — FOOTE, W. C.: Ovulation and *corpus luteum* maintenance in ewes treated with $^{17}\beta$ -oestradiol. J. Reprod. Fert., 16, 1968, s. 253-259.

POLAN, M. L. — BEHRMAN, H. R.: Prolactin-stimulated ovarian androgen metabolism. Am. J. Obstet. Gynec., 139, 1981, s. 487-491.

SMIRNOVA, E. I.: Vzájemsvяз funkci jajičnika s gipotalamo-gipofizarnoj sistemoj. Veterinarija, 4, 1981, s. 55-56.

WANG, P. S. — LIU, T. C. — JACKSON, G. L.: Effects of thyroidectomy and thyroxine therapy on biosynthesis and release of luteinizing hormone by rat anterior pituitary glands *in vitro*. Biol. Reprod., 23, 1980, s. 752-759.

WILTBANK, J. N. — INGALIS, J. E. — ROWDEN, W. W.: Effects of various forms and levels of estrogens alone or in combinations with gonadotrophins and the estrous cycle of beef heifers. J. Anim. Sci., 20, 1961, s. 341-346.

Došlo dňa 10. 5. 1982

ЭЛЕЧКО, Я. — БЕКЕОВА, Э. — ХОМА, Я. — МАРАЧЕК, И. (Институт экспериментальной ветеринарии, отдел воспроизводства скота, Кошице): Концентрация прогестерона и тироксина в лютеальной фазе цикла нетелей после обработки эстрадиол-бензоатом. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 705-714.

Рассматривали влияние текущей 48-часовой инфузии эстрадиол-бензоата (ЭБ) на динамику, концентрации прогестерона (П) и тироксина (Т₄) у 4 нетелей в лютеальной фазе цикла. Параметры оценивали в 3 интервала: инфузийный (А), послеинфузийный (В) и «без влияния» (С). В ходе инфузии концентрации Р у 3 животных показали нисходящую тенденцию. Повышенная концентрация П на 36-м часу инфузии сохранялась и во время интервала В, а ее понижение в интервале С к концу снова сменилось заметным ростом. Лишь у одной нетели в начале инфузии ЭБ концентрация П повышалась, но к концу интервала

понижались. В интервале В она понижалась, а в интервале С она понижалась на 268-м часу. Концентрация Т₄ у 3 нетелей в интервалах А и В была низкой, а в С несколько возрастала (у одной нетели же слабо повышалась) с падениями в интервалах В и С. С помощью ректального исследования у 3 животных установили желтое тело, а у одного — на яичнике; на 88-й час у этой нетели появились признаки охоты. На основе динамики гормонов и клинической картины гормоны щитовидной железы можно считать важным вторичным фактором, участвующим в прочих циклических изменениях в процессе воспроизводства.

инфузия эстрадиол-бензоата; динамика концентрации прогестерона и тироксина

ELEČKO, J. — BEKEOVÁ, E. — CHOMA, J. — MARAČEK, I. (Institute of Experimental Veterinary Medicine, Department of Farm Animal Reproduction, Košice): *Progesterone and Thyroxine Concentration in the Luteal Stage of Heifer Cycle as Influenced by Estradiol Benzoate*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12): 705-714.

The effect of current 48-hour infusion of estradiol benzoate (EB) on the dynamics of the concentration of progesterone (P) and thyroxine (T₄) was studied in four heifers in the luteal stage of their cycle. The parameters were evaluated in three intervals: infusion (A), post-infusion (B) and "uninfluenced" interval (C). In the course of infusion the concentrations of P in three animals had a markedly descending tendency. The P concentration increase in the 36th hour of infusion was maintained also during the post-infusion interval. The decrease in P in the third, "uninfluenced", interval was replaced by a new rise towards the end. One heifer showed an increase in P concentrations at the beginning of EB infusion. A decrease was recorded towards the end of the interval. The concentration decreased in the post-infusion period. A comparatively high concentration of P in the "uninfluenced" interval was again replaced by a drop towards the end in the 286th hour. The concentration of T₄ in three heifers had a descending tendency in the infusion and post-infusion intervals. The decrease in the infusion interval was more pronounced. In the "uninfluenced" interval the T₄ concentrations increased step by step. In one heifer the concentration of T₄ slightly increased during infusion. A decrease was recorded in the post-infusion and "uninfluenced" interval. Rectal examination in the 172nd hour revealed the original *corpus luteum* in three animals and the production of the *corpus luteum* in the same ovary was found in this period in one heifer. In the 88th hour this animal showed clinical manifestations of oestrus. On the basis of the dynamics of the studied hormones and clinical studies, the thyroid hormones can be regarded as an important secondary factor involved in the permanent cyclic changes in reproduction process.

infusion; estradiol benzoate infusion; progesterone and thyroxine concentration dynamics

ELEČKO, J. — BEKEOVÁ, E. — CHOMA, J. — MARAČEK, I. (Institut für experimentelle Veterinärmedizin, Abteilung für Reproduktion von Nutztieren, Košice): *Konzentration von Progesteron und Thyroxin in der Lutealphase des Zyklus von Färsen nach der Beeinflussung durch Estradiol Benzoat*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12): 705-714.

Es wurde der Einfluß einer durchlaufenden 48stündigen Infusion von Estradiol Benzoat (EB) auf die Dynamik der Konzentration von Progesteron (P) und Thyroxin (T₄) bei vier Färsen in der Lutealphase des Zyklus bewertet. Parameter wurden in drei Intervallen bewertet: Infusionsintervall (A), Postinfusionsintervall (B) und „nicht beeinflusst“ Intervall (C). Im Laufe der Infusion wiesen die Konzentrationen von P bei drei Tieren eine deutlich sinkende Tendenz auf. Eine erhöhte Konzentration von P in der 36. Stunde der Infusion erhielt sich auch während des Postinfusionsintervalles. Die Senkung von P im dritten „nicht beeinflusst“ Intervall wurde am Ende wieder durch seinen deutlichen Anstieg abgelöst. Bei einer Färse kam es am Anfang der Infusion von EB in den Konzentrationen von P zu einem Anstieg. Eine Senkung wurde gegen Ende des angeführten Intervalls verzeichnet. Im Postinfusionsintervall sank die Konzentration. Eine verhältnismäßig hohe Konzentration von P wurde im Laufe des „nicht beeinflusst“ Intervalls gegen Ende wieder durch eine Senkung in der 268. Stunde abgelöst. Konzentrationen von T₄

wiesen bei drei Färsen im Infusions- und auch Postinfusionsintervall eine sinkende Tendenz auf. Die Senkung war im Laufe der Infusion deutlicher. In dem „nicht beeinflussen“ Intervall erhöhten sich die Konzentrationen von T₄ allmählich. Bei einer Färsen erhöhte sich mäßig die Konzentration von T₄ während der Infusion. Eine Senkung wurde im Postinfusions- und auch im „nicht beeinflussen“ Intervall verzeichnet. Durch eine Rektaluntersuchung in der 172. Stunde wurde bei drei Tieren ein ursprünglicher gelber Körper und bei einer Färsen in derselben Zeit die Bildung des gelben Körpers an demselben Eierstock festgestellt. In der 88. Stunde wurden bei diesem Tier klinische Zeichen der Brunst ermittelt. Aufgrund der Dynamik von verfolgten Hormonen und einer klinischen Beobachtung kann man die Hormone der Schilddrüse für einen bedeutenden Sekundärfaktor halten, der an zyklischen Daueränderungen im Reproduktionsprozeß teilnimmt.

Infusion; Infusion von Estradiol Benzoat; Dynamik der Konzentration von Progesteron und Thyroxin

Adresy autorov:

Prof. MVDr. Ján Elečko, CSc., Vysoká škola veterinárska, Komenského 73, 040 01 Košice

MVDr. Eva Bekeová, CSc., MVDr. Ján Choma, CSc., MVDr. Imrich Maraček, CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Dukelských hrdinov 1, 040 01 Košice

HLADINA TESTOSTERONU A 17- β -ESTRADIOLU V SEMENNÉ PLAZMĚ BÝKŮ A KANCŮ

J. Kozumplík, A. Vinkler

KOZUMPLÍK, J. — VINKLER, A. (Vysoká škola veterinární, Brno): *Hladina testosteronu a 17- β -estradiolu v semenné plazmě býků a kanců*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 715-720.

Hladina testosteronu (T) a 17- β -estradiolu (E₂) byla určována ze semenné plazmy přímou RIA metodou s testosteronem a 17- β -estradiolem označeným tritiem. Testosteron byl určen ze 47 ejakulátů a E₂ ze 132 ejakulátů sedmi býků, jejichž věk kolísal od 10 do 26 měsíců, a v 60 ejakulátech dvou plemenných kanců 20 měsíců starých. V semenné plazmě býků bylo zjištěno $2,09 \pm 1,67$ nmol/l testosteronu a $2,75 \pm 1,94$ nmol/l E₂. Bez ohledu na věk sledovaných plemenů hraniční hodnoty sledovaných steroidů poměrně značně kolísaly, takže průměrné hodnoty se mezi jednotlivými plemeny významně neliší. Nebyl zjištěn vztah mezi úrovní hladiny steroidů a koncentrací fruktózy, a to jak u býků plodných, tak u plemena stíženého zánětem nadvarlete s tvorbou cyst nadvarlete. U plemenných kanců bylo zjištěno v semenné plazmě 0,338 nmol/l E₂ ($\pm 0,3$) a $6,40 \pm 4,01$ nmol/l testosteronu. Při přepočtu zjištěných hodnot na průměrný objem ejakulátu se v 5 ml semenné plazmy býků vyskytuje asi 0,013 nmol E₂ a 0,010 nmol T a v 300 ml semenné plazmy kanců je asi 0,101 nmol E₂ a 1,920 nmol T.

seminální tekutina; steroidy; koncentrace fruktózy

Ve spermatu různých druhů hospodářských zvířat, stejně jako v seminální tekutině mužů, byly stanoveny steroidy, jejichž úloha byla studována vzhledem k spermiogenezi a průchodu spermií nadvarletem (Orgebin — Crist aj., 1975; Ganjam a Mann, 1973 a jiní). Bovinní tekutina z *rete testis* i z ocasu nadvarlete obsahuje četné androgeny v koncentracích od 5 do 114 nmol/l a estronu spolu s estradiolem od 40 do 90 pmol/l. Jak uvádějí Hammerstedt a Mann (1976), mění se v prostředí, v němž jsou spermie v určitém vývojovém stadiu, androgeny (jako např. androstendion) na androstandion a dále pravděpodobně na dehydroepiandrosteron a testosteron na androstendion a dihydrotestosteron, když je ve tkáni semenoplodných kanálků přítomna 5- α -oxidoreduktáza. Přeměny androgenů u býků, kanců, hřebců, lidí a psů popisují Casteneda aj. (1974), Seamark a White (1964) a jiní. Předpokládá se, že ani jeden ze steroidů zjišťovaných ve spermiální tekutině není nezbytný pro rozvoj dalších funkcí spermií, ale že steroidy mají významný vliv na činnost epiteliálních buněk nadvarlat, které ovlivňují prostředí, jímž procházejí spermie.

V jiných pracích byla zkoumána androgenní aktivita ve vztahu k testikulární inkreci (Navrátil aj., 1975), posuzovány byly také vztahy mezi spermiologickými, biochemickými, endokrinologickými a fertilizačními ukazateli (Navrátil a Forejtek, 1981). Zvláště

byla zkoumána estrogenní a androgenní aktivita ejakulátů podle reakce pohlavních orgánů infantilních laboratorních zvířat, nebo podle reakce muskulatury izolovaných pohlavních orgánů samic (Raboch a Řežábek, 1962; Kozumplík, 1964; Churý aj., 1967; Bower aj., 1981 aj.). Různá doba ovulace, ke které dochází nejpozději u prasniček nepřipuštěných, poněkud dříve u prasnic inseminovaných a nejdříve u prasnic krytých kancem, poukazuje nejen na dráždění nervových receptorů (Pitkjanen, 1961), ale i na možné ovlivňování říjového cyklu prostřednictvím steroidů semenné plazmy.

MATERIÁL A METODA

Ke stanovení testosteronu (T) a 17- β -estradiolu (E₂) v semenné plazmě býků a kanců byla použita přímá radioimunobiologická metoda s testosteronem a 17- β -estradiolem značeným tritiem (Stupnicki, 1975). U 60 ejakulátů dvou plemenných kanců byl stanoven T i E₂. V semenné plazmě sedmi plemenných býků byl ve 132 případech stanoven obsah E₂ a ve 47 případech T. Jeden ze sledovaných býků byl neplodný (č. 7) v důsledku oboustranného zánětu nadvarlat a vzniku cyst v hlavě nadvarlat. Věk býků se pohyboval mezi 10 až 26 měsíci, kanci byli 20 měsíců staří.

Steroidy byly určovány ze semenné plazmy po oddělení spermií centrifugací a dodatečnou filtrací přes celulóзовý filtr. V ejakulátech býků byla souběžně stanovena také hladina fruktózy. Semenná plazma byla zmrazena a uchovávána při teplotě -30 °C vždy do té doby, než bylo získáno k sériovému vyšetření nejméně 30 vzorků. U býků byl k určení steroidů zpracováván vždy celý ejakulát, zatímco u kanců byla zachycována při odběru semene jen druhá a třetí frakce.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Jak vyplývá z tab. I, byl zjišťován v semenné plazmě kanců obsah E₂ v hranicích od 0,007 nmol/l do 1,303 nmol/l (v průměru 0,338 nmol/l). Z vyšetření vyplynulo, že mezi oběma zvířaty jsou poměrně značné rozdíly v obsahu E₂ v semenné plazmě, ale vzhledem k značnému kolísání krajních hodnot nejsou rozdíly statisticky významné.

I. Rozdíly v obsahu testosteronu a 17- β -estradiolu v semenné plazmě kanců — The differences in the content of testosterone and 17- β -estradiol in the seminal plasma of boars

Kanec číslo	n	Testosteron nmol/l	Estradiol nmol/l
1	30	4,56 ±1,71 2,08 — 10,40	0,174 ±0,089 0,007 — 0,349
2	30	8,24 ±4,78 1,04 — 19,41	0,494 ±0,352 0,081 — 1,303
Celkem	60	6,40 ±4,01 1,04 — 19,41	0,338 ±0,300 0,007 — 1,303

II. Obsah testosteronu, 17- β -estradiolu a fruktózy v semenné plazmě býků — The content of testosterone, 17- β -estradiol and fructose in the seminal plasma of bulls

Býk číslo	n		Testosteron nmol/l	Estradiol nmol/l	Fruktóza nmol/l	Věk býka (měsíce)
	T	E ₂				
1	7	25	2,77 ±2,11 0,69 – 6,95	2,47 ±1,38 0,37 – 6,24	14,94 ±0,88 0,00 – 32,19	24
2	7	27	1,14 ±0,71 0,35 – 2,43	4,15 ±2,52 0,37 – 8,81	39,94 ±13,97 17,76 – 71,05	18
3	10	24	2,11 ±1,89 1,04 – 6,93	2,72 ±1,70 0,37 – 7,34	38,70 ±12,28 17,76 – 71,05	26
4	8	22	1,82 ±1,21 0,69 – 4,40	2,51 ±1,85 0,37 – 7,34	37,37 ±16,65 19,98 – 93,26	26
5	5	15	1,87 ±1,84 0,35 – 5,20	1,78 ±1,44 0,37 – 6,24	53,09 ±14,35 31,31 – 80,40	12
6	5	12	2,70 ±2,27 1,04 – 6,59	1,65 ±0,94 0,37 – 3,30	50,70 ±12,74 33,31 – 75,49	10
7 ⁺	5	7	2,43 ±1,43 0,20 – 1,20	2,99 ±1,84 1,10 – 5,51	34,55 ±24,63 17,76 – 71,05	20
Celkem	47	132	2,09 ±1,67 0,35 – 6,93	2,75 ±1,94 0,37 – 8,81	35,37 ±18,98 0,00 – 93,26	—

Obsah T je v semenné plazmě kanců poměrně vysoký, zvláště ve srovnání s obsahem T u býků. Ale obdobně jako v případě E₂ je možné i u T pozorovat značné kolísání krajních hodnot. I když je proto průměrná hodnota T u kance č. 2 téměř dvojnásobně vyšší než u kance č. 1, nejsou rozdíly v průměrných hodnotách T statisticky významné.

V semenné plazmě býků (tab. II) bylo zjišťováno také značné kolísání hladiny E₂ (0,37 až 8,81 nmol/l) a v průměru bylo stanoveno 2,75 nmol/l. Kolísání hladiny E₂ nemělo přímý vztah k zjišťované hladině fruktózy a jednoznačně ani k věku býků, i když u nejmladších býků byly zjištěny v průměru nejnižší hladiny E₂. Od stanoveného prů-

měru se nelišily ani výsledky obsahu E₂ v semenné plazmě býka stíženého zánětem nadvarlat s tvorbou cyst v hlavě nadvarlat (býk č. 7). Obdobný obraz jako v případě E₂ jsme zjišťovali i u hladin T. V obsahu T semenné plazmy býka se zánětem nadvarlat a býků zdravých nebyl rozdíl. Nezjistili jsme ani vztah mezi obsahem fruktózy a hladinou T v semenné plazmě, stejně jako mezi věkem zvířat a hladinou hodnoceného steroidu.

Tab. I a II zachycují obsah zjišťovaných steroidů v mezinárodně ustálených měrných veličinách, ale toto hodnocení zcela nevyjadřuje obsah steroidů, které se vyskytují v celém ejakulátu daných druhů zvířat. Vezmeme-li jako průměrný objem ejakulátu býka 5 ml, pak se v tomto objemu vyskytuje asi 0,013 nmol E₂ a 0,010 nmol T. V ejakulátu kance o průměru 300 ml je asi 0,101 nmol E₂ a 1,920 nmol T.

Výsledky udávané jinými autory nejsou zcela jednotné a zpravidla se vzájemně liší podle použité metodiky a podle cíle šetření. Ve starších pracích je určována estrogenní nebo androgenní aktivita podle reakce pohlavních orgánů laboratorních zvířat, jimž byl extrakt spermatu aplikován (Raboch a Řežábek, 1962; Řežábek a Raboch, 1963; Fachini, 1962). Uvedení autoři při diskusi o možném působení estrogenů na samičí pohlavní orgány předpokládají, že je třeba počítat s aktivitou těchto látek vždy z celého ejakulátu. Z výsledků vlastních pokusů shrnují, že ve 4 ml semene muže je asi 0,073 nmol E₂. Diczfalusy (1954), který určoval hladinu estrogenů fluorometrickou metodou, uvádí, že ve 4 ml semene je asi 0,146 nmol všech estrogenů. Reiffsteck aj. (1981) zjišťovali pomocí RIA metody na litr seminální plazmy muže 0,07 nmol volného E₂ a spolu s vázaným E₂ 0,87 nmol. Stejní autoři zjistili v semenné plazmě býka 0,040 nmol volného E₂ a 0,68 nmol volného spolu s konjugovaným E₂ a v seminální plazmě kance 0,092 volného a 0,65 nmol volného spolu s vázaným E₂ v litru. Při srovnání s našimi výsledky je možné konstatovat, že u býků jsme zjišťovali vyšší hladiny E₂, zatímco u kanců poněkud nižší, než uvádějí Reiffsteck aj. (1981). Jak je patrné z našich výsledků, mohou vzniknout určité rozdíly nejen použitím rozdílné metodiky, ale také zastoupením zvířat s typicky vyšším nebo nižším obsahem estrogenních látek.

Pokud se týká testosteronu, byl jeho uterotrofní účinek hodnocen v ejakulátu muže podstatně méně významněji než E₂ (Řežábek a Raboch, 1963). Ganjam a Armann (1973) uvádějí, že bovinní tekutina z *rete testis* a *cauda epididymis* obsahuje četné androgeny v koncentracích od 5 do 114 nmol/l. Samotný testosteron byl zjišťován v koncentracích kolem 33,1 nmol/l. Navrátil a Forejtek (1981) zjišťovali v seminální tekutině kanců $3,33 \pm 1,94$ nmol/l testosteronu, což je blízké našim výsledkům. Proti koncentraci T z *rete testis* jsou hladiny T v seminální plazmě výrazně nižší, což by mohlo odpovídat i názorům o přeměně testosteronu na další steroidy, které jsme nesledovali.

Z našeho vyšetření vyplývá, že na průměrný objem ejakulátu kanců připadá větší množství E₂ i T, než se zjišťuje u průměrného ejakulátu býků, což se shoduje i s nálezy, o nichž informovali Reiffsteck aj. (1981).

Mohou-li steroidy — kromě působení na epiteliální buňky varlat a nadvarlat v průběhu spermiogeneze — působit ještě na pohlavní orgány samičí, jak bylo také prokázáno, bylo by třeba s touto skutečností

počítat i při ředění spermatu pro účely inseminace, a to především u těch druhů zvířat, u nichž se vyskytují ve větší míře jak steroidy, tak i další farmakologicky účinné látky.

Literatúra

- BOWER, R. E. (Jr.) — CRABO, B. G. — GRAHAM, E. F.: The *in vitro* effect of boar semen on the contractility of rat uteri. *Theriogenology*, 1981, č. 5, s. 553-563.
- CASTEÑEDA, R. — RIOS, E. P. — PEREZ, A. E. — et al.: *In vitro* biotransformation of steroid hormones by human semen. *Fertil. Steril.*, 25, 1974, s. 261-270.
- DICZFALUSY, E.: Characterisation of the estrogens in human semen. *Acta endocr., Copenh.*, 15, 1954, s. 317.
- FACHINI, G.: Sulla attività estrogena del materiale seminale. XXV^o anno dalla fondazione dello istituto sperimentale italiano „L. Spallanzani“ per la fecondazione artificiale, 1962, s. 253-261.
- GANJAM, V. K. — AMANN, R. P.: Testosterone and dihydrotestosterone concentrations in the fluid milieu of spermatozoa in the reproductive tract of the bull. *Acta endocr., Copenh.*, 74, 1973, s. 186-200.
- HAMMERSTEDT, R. H. — AMMAN, R. P.: Interconversions of steroids by intact bovine sperm and epididymal tissue. *Biol. Reprod.*, 15, 1976, s. 686-694.
- CHURÝ, J. — KOZUMPLÍK, J. — ŠIMŮNEK, J.: Über die Beziehungen zwischen Fruchtbarkeit und uterotrophen Wirkung von Sperma. *Acta Univ. agric., Fac. vet., Brno*, 1, 1967, s. 295-298.
- KOZUMPLÍK, J.: Estrogenní aktivita v ejakulátu kance. *Vet. Med., Praha*, 9, 1964, č. 2, s. 109-114.
- NAVRÁTIL, S. — HRUŠKA, K. — SCHLEGLOVÁ, J. — FRÁNEK, M. — MATOUŠKOVÁ, O.: Výzkum funkční testace testikulární inkrece k hodnocení androgenní aktivity u kanců. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1975, 56 s.
- NAVRÁTIL, S. — FOREJTEK, P.: Vztahy mezi některými spermio-logickými, biochemickými, endokrino-logickými a fertilizačními ukazateli kančích ejakulátů. *Vet. Med., Praha*, 26, 1981, č. 9, s. 543-552.
- ORGBIN-CRIST, M. C. — DANZO, B. J. — DAVIES, J.: Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing activity in the epididymis. *Handbook of physiology*, Washington: American physiological society, 1975, s. 319-338.
- PITKJANEN, J. G.: Nowe v oplodotvorenii i povyšennii plodovitosti svinej. *Selchoz-giz, Moskva*, 1961, s. 185.
- RABOCH, J. — RERÁBEK, K.: Estrogenní aktivita v lidském ejakulátu. *Čs. Gynecol.*, 1962, č. 6-7, s. 544-549.
- REIFFSTECK, A. — DEHENNIN, L. — SCHOLLER, R.: Concentrations d'estrone et d'estradiol-17-beta déterminées par dilution isotopique — spectrométrie de masse dans les plasmas séminaux d'homme, de taureau et de verrat. *Extract de Pathologie Biologie*, Paris, 29, 1981, s. 321-388.
- REZÁBEK, K. — RABOCH, J.: Podíl androgenů na uterotrofní aktivitě normálního lidského ejakulátu. *Čs. Gynecol.*, 1963, č. 9, s. 610-612.
- SEAMARK, R. F. — WHITE, I. G.: The metabolism of steroid hormones in semen. *J. Endocr.*, 30, 1964, s. 307-321.
- STUPNICKI, R.: Direct radioimmunoassay of progesterone in plasma of farm animals. *Endokrinologie, B*, 66, 1975, č. 2, s. 145-151.

Došlo dne 4. 6. 1982

KOZUMPLÍK, J. — VINKLER, A. (Institut veterinární, Brno): Uroveň testosteronu a 17-beta-estradiola v semenной плазме быков и хряков. *Vet. Med., Praha*, 27, 1982 (12): 715-720.

Uroveň testosteronu (T) a 17-beta-estradiola (E2) určovali na основе semenной плазмы по прямому RIA-методу с тестостероном и E2 обозначенным тритием. T určovali в 47 эякулятах, а E2 — в 132 эякулятах 7 быков в возрасте от 10 до 26 месяцев, а также в 60 эякулятах двух производителей в возрасте 20 месяцев. В их semenной плазме отметили $2,09 \pm 1,67$ нмол/л T и $2,75 \pm 1,94$ нмол/л E2. Независимо от возраста быков, лимитные значения стероидов колеблются, и средние значения не отличаются резко между быками.

Не установлено отношения между уровнем стероидов концентрацией фруктозы — причем как у плодовых быков, так и воспалениями надсеменника и с его кистами. В семенной плазме хряков установлено $0,338 \text{ нмол/л E}_2 (\pm 0,3)$ и $6,40 \pm 4,01 \text{ нмол/л T}$. При пересчете на средний объем эякулята в 5 мл семенной плазмы быков содержится около $0,013 \text{ нмол E}_2$ и $0,010 \text{ нмол T}$, а в 300 мл семенной плазмы хряков — около $0,101 \text{ нмол E}_2$ и $1,920 \text{ нмол T}$.
семенная жидкость; стероиды; концентрация фруктозы

KOZUMPLÍK, J. — VINKLER, A. (University of Veterinary Medicine, Brno): *The Levels of Testosterone and 17-beta-estradiol in the Seminal Plasma of Bulls and Boars*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 715-720.

The levels of testosterone (T) and 17-beta-estradiol (E₂) in seminal plasma were determined by the direct RIA method with tritium-labelled testosterone and 17-beta-estradiol. Testosterone was determined in 47 ejaculates and E₂ in 132 ejaculates of seven bulls whose age ranged from 10 to 26 months, and in 60 ejaculates of two breeding boars old 20 months. The seminal plasma of bulls was found to contain $2.09 \pm 1.67 \text{ nmol/l}$ testosterone and $2.75 \pm 1.94 \text{ nmol/l E}_2$. Without respect to the age of the sires, the marginal values of the studied steroids showed a comparatively high fluctuation so that the average values are not very different between individual animals. No relation was found between the level of steroids and the concentration of fructose; this applies to the fertile bulls as well as to the bull suffering from epididymitis with the formation of epididymal cysts. Breeding boars had $0.338 \text{ nmol/l E}_2 (\pm 0.3)$ and $6.40 \pm 4.01 \text{ nmol/l}$ testosterone in their seminal plasma. When the obtained values are recalculated to an average ejaculate volume, 5 ml of the seminal plasma of bulls will contain about 0.013 nmol E_2 and 0.010 nmol T and 300 ml of the seminal plasma of boars will contain about 0.101 nmol E_2 and 1.920 nmol T .

seminal liquid; steroids; fructose concentration

KOZUMPLÍK, J. — VINKLER, A. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): *Spiegel von Testosteron und 17-Beta-Estradiol im Samenplasma von Bullen und Ebern*, Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 715-720.

Der Spiegel von Testosteron (T) und 17-Beta-Estradiol (E₂) wurde im Samenplasma durch die direkte RIA-Methode mit Testosteron und 17-Beta-Estradiol, das mit dem Tritium bezeichnet wird, festgelegt. Testosteron wurde aus 47 Ejakulaten und E₂ aus 132 Ejakulaten von sieben Bullen, deren Alter von 10 bis 26 Monaten schwankte, und aus 60 Ejakulaten von zwei Zuchtebern im Alter von 20 Monaten festgelegt. Im Samenplasma wurden $2,09 \pm 1,67 \text{ nmol/l}$ Testosteron und $2,75 \pm 1,94 \text{ nmol/l}$ festgelegt. Ohne Rücksicht aufs Alter von verfolgten Zuchttieren schwankten verhältnismäßig beträchtlich die Grenzwerte von verfolgten Steroiden, so daß die Durchschnittswerte sich zwischen den einzelnen Zuchttieren nicht bedeutend unterscheiden. Es wurde kein Zusammenhang zwischen dem Niveau des Spiegels von Steroiden und der Konzentration der Fruktose, und zwar sowohl bei fruchtbaren Bullen, als auch beim mit der Entzündung der Nebenhoden mit der Bildung von Zysten der Nebenhoden befallenen Bullen festgestellt. Bei Zuchtebern wurden im Samenplasma $0,338 \text{ nmol/l E}_2 (\pm 0,3)$ und $6,40 \pm 4,01 \text{ nmol/l}$ Testosteron festgestellt. Bei der Umrechnung der festgestellten Werte auf das durchschnittliche Volumen von Ejakulat kommen in 5 ml Samenplasma von Bullen etwa $0,013 \text{ nmol E}_2$ und $0,010 \text{ nmol T}$ und in 300 ml Samenplasma von Ebern etwa $0,101 \text{ nmol E}_2$ und $1,920 \text{ nmol T}$ vor.

Samenflüssigkeit; Steroide; Konzentration der Fruktose

Adresa autorů:

Prof. MVDr. Jaroslav Kozumplík, CSc., MVDr. Antonín Vinkler, CSc.,
Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

STANOVENIE STRÁVITEĽNOSTI LIGNOCELULÓZOVÝCH MATERIÁLOV VRECÚŠKOVOU (NYLON BAG) METÓDOU

D. Jalč, I. Zelenák, M. Baran

JALČ, D. — ZELEŇÁK, I. — BARAN, M. (Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice): *Stanovenie stráviteľnosti lignocelulózových materiálov vrecúškovou (nylon bag) metódou*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 721-728.

V pokuse na škopoch sme sledovali stráviteľnosť rôznych lignocelulózových materiálov (LCM) vrecúškovou metódou. Zvieratá boli kŕmené dobrým lúčnym senom *ad libitum*, pričom mali prístup k vode a k minerálnemu lizu pre ovce. Priebeh pokusu ukázal, že stráviteľnosť LCM nebola ovplyvnená rôznou hmotnosťou návažku substrátu. Pri stúpajúcej dobe fermentácie v bachore sa však ich stráviteľnosť zvyšovala. Takmer 90 % i viac sušiny jednotlivých substrátov (čistej sulfátovej celulózy, jačmennej slamy a upravených bukových pilín) bolo strávené pri 48-hodinovej fermentácii v bachore. Podobne je tomu aj pri 96-hodinovej fermentácii týchto substrátov v podmienkach *in vitro*. Svedčia o tom vysoké korelačné koeficienty vypočítané z hodnôt stráviteľnosti týchto substrátov v podmienkach *in vitro* a *in vivo*. Výnimku predstavujú neupravené bukové piliny, u ktorých sme tento vysoký korelačný vzťah nezistili, najmä z dôvodu ich nízkej stráviteľnosti. Bude však potrebné si túto skutočnosť overiť testovaním iných druhov neupraveného dreva (osika, javor, jaseň), avšak o vyššej stráviteľnosti. Je nutné konštatovať, že na výrobu vrecúškov je najvhodnejší letecký hodváb o veľkosti ôk 50 μ .

bachorová fermentácia; slama; celulóza; bukové piliny; stráviteľnosť *in vivo*

Vrecúšková metóda je často využívaná na stanovenie stráviteľnosti rôznych druhov krmív — objemových krmív, siláží, koncentrátov a granulovaného krmiva (Lowrey, 1969; Bailey a Hironaka, 1970; Playne a i., 1978), no nebola použitá na stanovenie stráviteľnosti sušiny a ostatných živín lignocelulózových materiálov (Short a i., 1974).

Vrecúškovú metódu sme podľa literárnych poznatkov modifikovali na naše podmienky. Stanovenie stráviteľnosti lignocelulózových materiálov (LCM) vrecúškovou metódou bolo uskutočnené z aspektu:

- a) hmotnosti substrátu suspendovaného do vrecúška,
- b) doby fermentácie substrátu,
- c) hustoty steny vrecúška z nestráviteľného materiálu, a za účelom štandardizácie podmienok, v ktorých je možná dostatočná fermentácia substrátu (LCM) v bachore.

MATERIÁL A METÓDY

Pokus bol uskutočnený na šiestich dospelých škopoch plemena merino o hmotnosti 45,0 až 50,0 kg, vybavených permanentnou bachorovou fistulou. Pre pokusné účely boli vyrobené fistuly z novoduru s vnútorným priemerom 3,0 cm a s vonkaj-

Materiál	Veľkosť ôk	Prietok vzduchu v l/min.
Letecký hodváb č. 1	50 μ	500—700
Letecký hodváb č. 2	5 μ	50—100
Letecký hodváb č. 3	100 μ	2000

ším priemerom 6,5 cm. Zvieratá dobre znášali naoperované fistuly, pričom počas celého pokusu neboli pozorované poruchy ich zdravotného stavu. Kŕmené boli dvakrát denne dobrým lúčnym senom *ad libitum*. Okrem toho mali zvieratá prístup k vode a k minerálnemu lizu pre ovce. Na stanovenie stráviteľnosti vrecúškovou metódou sme ako substrát použili:

- neupravené bukové piliny,
- upravené bukové piliny,
- čistú sulfátovú celulózu,
- jačmennú slamu.

Vzorky týchto sekundárnych zdrojov dreva boli mleté cez sito a do vrecúšok bola suspendovaná ich frakcia medzi 0,8 až 1,0 mm. Množstvo substrátu dodané do vrecúška bolo rôzne — 0,25, 0,50, 0,75 a 1,0 g. Na výrobu vrecúšok bol použitý letecký hodváb s tromi rôznymi hustotami steny (tab. I). Vhodnosť použitia týchto troch typov leteckého hodvábu bola ověřená ponorením vrecúšok do vody. Vrecúška so substrátom boli neustále premiešavané vo vode elektromagnetickou miešačkou po dobu 24, 48, 72 a 96 hodín. Zistili sme, že počas týchto skúšok neprešlo cez stenu vrecúška ušitého z materiálu č. 1 a 2 viac než 0,001 až 0,003 g substrátu. Ako nevhodný sa ukázal letecký hodváb č. 3, keďže cez jeho stenu došlo k značnému úbytku substrátu.

Pri pokuse teda boli použité len vrecúška vyrobené z leteckého hodvábu č. 1 a 2. Cez bachorovú fistulu zvierata bolo suspendovaných šesť vrecúšok priviazaných na rybárskom silone dlhom 45 cm, čím sa zabezpečilo ich vníknutie do ventrálneho bachorového vaku. Dĺžka fermentácie substrátu v bachore bola 24, 48, 72 a 96 hodín. Vrecúška boli suspendované do bachora päť hodín po rannom kŕmení, pričom predtým boli sušené do konštantnej hmotnosti pri teplote 105 °C (cca šesť hodín). Po vybratí vrecúšok z bachora, t. j. po ukončení fermentácie substrátu, sme ich premývali tečúcou vodou tak dlho, pokiaľ voda vychádzajúca z vrecúška nebola čistá (cca 30 minút). Po premytí sme vrecúška sušili 24 hodín pri teplote 105 °C do konštantnej hmotnosti.

Stráviteľnosť sušiny sme vypočítali podľa vzorca použitého pri metóde *in vitro*. Ako kontrola slúžilo prázdne vrecúško suspendované do bachora. Pri vrecúškovej metóde odporúčame minimálne šesť paralelných stanovení jednotlivých substrátov (v tabuľkách uvedené hodnoty stráviteľnosti sú priemerom deviatich stanovení).

VÝSLEDKY

V tab. II až V sú uvedené hodnoty stráviteľnosti jednotlivých substrátov, stanovené vrecúškovou metódou. Ako vyplýva z tabuliek, stráviteľnosť substrátov bola ovplyvnená rôzne dlhou fermentačnou dobou. Prejavilo sa to u čistej sulfátovej celulózy, jačmennej slamy a upravených bukových pilín.

Pri použití vrecúšok z hodvábu č. 1 prebehlo 50 až 60 % trávenia celulózy prvých 24 hodín fermentácie. Ďalšou 24-hodinovou fermentáciou sa dosiahla takmer maximálna (94—99%) stráviteľnosť. Predĺženie doby fermentácie na 72, resp. 96 hodín nemenilo stráviteľnosť tohto substrátu, resp. malo tendenciu ju zvýšiť až na 100 %. Celulóza vložená do vre-

II. Priemerné hodnoty stráviteľnosti celulózy stanovené vrecúškovou metódou —
The average values of cellulose digestibility determined by the bag method

	Priepustnosť vrecúška	Doba fermentácie hodín	Množstvo substrátu v gramoch			
			0,25	0,50	0,75	1,0
Celulóza	5 μ	24	53,88 $\pm$ 1,85	37,71 $\pm$ 0,92	42,32 $\pm$ 2,00	35,94 $\pm$ 0,86
		48	97,26 $\pm$ 1,07	96,28 $\pm$ 1,11	92,87 $\pm$ 1,39	96,87 $\pm$ 1,93
		72	97,73 $\pm$ 0,61	97,88 $\pm$ 0,84	98,99 $\pm$ 0,61	98,94 $\pm$ 0,64
		96	96,97 $\pm$ 1,30	98,37 $\pm$ 1,04	99,23 $\pm$ 0,23	99,28 $\pm$ 0,49
	50 μ	24	53,59 $\pm$ 1,23	46,42 $\pm$ 2,44	64,78 $\pm$ 3,18	49,90 $\pm$ 2,21
		48	98,24 $\pm$ 0,55	99,59 $\pm$ 0,12	94,04 $\pm$ 1,76	97,05 $\pm$ 0,83
		72	97,28 $\pm$ 0,89	98,56 $\pm$ 0,40	97,30 $\pm$ 1,37	98,18 $\pm$ 0,78
		96	97,03 $\pm$ 1,63	98,66 $\pm$ 0,47	99,50 $\pm$ 0,28	99,54 $\pm$ 0,12

cúšok z hodvábu č. 2 bola tiež dostatočne strávená pri 24 a 48-hodinovej fermentačnej dobe, a to v rozsahu 37 až 53 %, resp. 92 až 97 %.

Z priemerných hodnôt stráviteľnosti celulózy (83,3 %) stanovených v podmienkach *in vitro* a *in vivo* (97,2 a 95,1 %) bol vypočítaný korelačný koeficient. Porovnávali sme hodnoty stráviteľnosti celulózy zistené pri 48-hodinovej fermentácii v bachore (*in vivo*) a pri 96-hodinovej fermentácii v podmienkach *in vitro*. Korelačný koeficient pre čistú sulfátovú celulózu pri použití vrecúšok z hodvábu č. 1 a 2 predstavoval hodnotu $r = 0,908$, resp. $0,928$.

U ďalšieho substrátu — jačmennej slamy sa tiež prejavili zmeny v stráviteľnosti pri stúpajúcej dobe fermentácie v bachore. Už pri 24-hodinovej fermentácii bola zistená 30% stráviteľnosť tohto substrátu. Po 48-hodinovej fermentácii sa stráviteľnosť jačmennej slamy zvýšila na

III. Priemerné hodnoty stráviteľnosti neupravených bukových pilín vrecúškovou metódou — The average values of the digestibility of untreated beech sawdust determined by the bag method

	Priepustnosť vrecúška	Doba fermentácie hodín	Množstvo substrátu v gramoch			
			0,25	0,50	0,75	1,0
NPB ⁺	5 μ	24	0,57 $\pm$ 0,46	0,59 $\pm$ 0,13	0,75 $\pm$ 0,18	0,43 $\pm$ 0,14
		48	1,15 $\pm$ 0,40	1,13 $\pm$ 0,36	0,43 $\pm$ 0,36	3,46 $\pm$ 1,02
		72	0,67 $\pm$ 0,17	0,95 $\pm$ 0,31	0,95 $\pm$ 0,44	1,49 $\pm$ 0,36
		96	1,18 $\pm$ 0,30	0,97 $\pm$ 0,12	0,51 $\pm$ 0,12	0,57 $\pm$ 0,16
	50 μ	24	1,32 $\pm$ 0,44	1,03 $\pm$ 0,62	2,84 $\pm$ 1,12	0,48 $\pm$ 0,11
		48	0,93 $\pm$ 0,44	3,84 $\pm$ 0,12	1,54 $\pm$ 0,71	0,48 $\pm$ 0,21
		72	1,89 $\pm$ 0,22	2,68 $\pm$ 0,19	3,63 $\pm$ 0,60	2,00 $\pm$ 0,21
		96	1,16 $\pm$ 0,24	2,61 $\pm$ 0,47	2,01 $\pm$ 0,61	0,96 $\pm$ 0,16

⁺NBP — neupravené bukové piliny

IV. Priemerné hodnoty stráviteľnosti slamy stanovenej vrecúškovou metódou — The average values of the digestibility of straw determined by the bag method

	Priepustnosť vrecúška	Doba fermentácie hodín	Množstvo substrátu v gramoch			
			0,25	0,50	0,75	1,0
Slama	5 μ	24	25,70 $\pm$ 1,95	26,74 $\pm$ 1,33	33,30 $\pm$ 1,61	32,74 $\pm$ 0,64
		48	44,68 $\pm$ 0,81	47,78 $\pm$ 0,33	41,51 $\pm$ 2,15	46,76 $\pm$ 3,38
		72	47,44 $\pm$ 2,25	46,22 $\pm$ 0,76	48,15 $\pm$ 1,69	55,03 $\pm$ 0,48
		96	52,65 $\pm$ 0,72	52,54 $\pm$ 0,67	57,12 $\pm$ 0,48	56,25 $\pm$ 0,88
	50 μ	24	28,23 $\pm$ 1,77	33,59 $\pm$ 1,83	42,44 $\pm$ 1,11	28,27 $\pm$ 2,77
		48	45,54 $\pm$ 1,05	48,12 $\pm$ 0,30	47,45 $\pm$ 0,57	46,43 $\pm$ 2,64
		72	44,83 $\pm$ 1,13	51,24 $\pm$ 1,97	50,71 $\pm$ 2,78	54,43 $\pm$ 1,51
		96	55,24 $\pm$ 1,90	54,63 $\pm$ 2,66	54,62 $\pm$ 0,69	59,52 $\pm$ 0,41

41 až 48 %. Minimálne zvýšenie stráviteľnosti bolo namerané pri 72 a 96-hodinovej fermentácii. Tieto zmeny v stráviteľnosti jačmennej slamy boli dosiahnuté pri použití oboch druhov vrecúšok. Korelačný koeficient, vypočítaný z hodnôt stráviteľnosti stanovených v podmienkach *in vitro* [47,8 %] a *in vivo* [46,8 a 45,4 %], predstavoval hodnotu $r = 0,980$, resp. $0,950$ pri použití vrecúšok z hodvábu č. 1 a 2.

Neupravené bukové piliny (NBP), použité v tomto pokuse ako tretí substrát, neboli fermentačnou aktivitou bachorovej mikroflóry ovplyvnené. Ako vidieť z tab. III, stráviteľnosť NBP sa pri stúpajúcej dobe fermentácie v bachore nemenila. Stráviteľnosť NBP sa pohybovala v rozmedzí 0,43 až 3,46, resp. 0,48 až 3,84 %. Skutočnosť, že stráviteľnosť NBP sa pri stúpajúcej dobe fermentácie v bachore nezvyšovala, sa prejavila aj v nízkom korelačnom vzťahu $r = 0,470$, resp. $0,410$ pri použití vrecúšok o veľkosti ôk 5, resp. 50 μ .

Priebeh tohto pokusu s použitím dvoch rôznych typov vrecúšok a rôznych substrátov ukázal, že hmotnosť návažku neovplyvňuje stráviteľnosť substrátu. Na výrobu vrecúšok sa ako najvhodnejší ukázal letec-

V. Priemerné hodnoty stráviteľnosti upravených bukových pilín stanovenej vrecúškovou metódou — The average values of the digestibility of treated beech sawdust determined by the bag method

Priepustnosť vrecúška		Doba fermentácie hodín	Množstvo substrátu v gramoch 1,0
UPB ⁺	50 μ	24	21,46 $\pm$ 0,72
		48	35,37 $\pm$ 0,46
		72	36,06 $\pm$ 0,64
		96	42,15 $\pm$ 0,31

⁺UPB — upravené bukové piliny

ky hodváb č. 1. Preto pri testovaní ďalšieho substrátu — upravených bukových pilín — bol použitý len jeden návažok a na výrobu vrecúšok len jeden typ hodvábu (tab. V). V pokuse sme použili defibrované bukové piliny upravené 1% hydroxidom sodným o stráviteľnosti *in vitro* 32,69 % pri 96-hodinovej fermentácii. Pri 48-hodinovej fermentácii tohto substrátu v bachore bola dosiahnutá 35,37% stráviteľnosť, teda podobná hodnote stráviteľnosti stanovenej v podmienkach *in vitro*. Korelačný koeficient vypočítaný z týchto hodnôt predstavuje $r = 0,920$.

DISKUSIA

Vrecúšková metóda stanovenia stráviteľnosti LCM bola použitá z aspektu:

- a) hmotnosti substrátu suspendovaného do vrecúška,
- b) doby fermentácie substrátu,
- c) hustoty steny vrecúška z nestráviteľného materiálu.

Fermentácia použitých substrátov bola uskutočnená vo ventrálnom bachorovom vaku, keďže Balch a Johnson (1950) a Miles (1951) zistili rýchlejšie trávenie v tejto časti bachora v porovnaní s trávením, ktoré prebieha v dorzálnom bachorovom vaku. Dostatočná celulolytická aktivita bachorovej mikroflóry bola zabezpečená kŕmením zvierat dobrým lúčnym senom. Tento druh objemového krmiva obsahuje minimálne 0,6 až 0,8 % dusíka, ktorý je potrebný pre účinný rozklad lignocelulózy (Pigden a Heaney, 1969). Celulolytická aktivita bachorovej mikroflóry bola stimulovaná aj minerálnymi látkami — sírou, horčíkom a vápnikom, ktoré sú obsiahnuté v minerálnych lizoch pre ovce a ku ktorým mali zvieratá prístup.

Do vrecúšok boli dané substráty o frakcii menšej než 1 mm; podobnú frakciu vzoriek použili vo svojich pokusoch Van Dyne (1962) a Rodriguez (1968). Hoci Lowrey (1969) zistil, že so stúpajúcim návažkom vzorky klesá stráviteľnosť, v našom pokuse s použitím substrátov o hmotnosti 0,25, 0,50, 0,75 a 1 g to nebolo potvrdené. Vrecúškovou metódou je možné stanoviť potenciálne maximum substrátu, ktoré môže byť strávené a absorbované počas pasáže cez gastrointestinálny trakt (Bailey a Hironaka, 1970).

Ako ukázal priebeh pokusov, hodnoty stráviteľnosti pri 96-hodinovej fermentácii substrátov v podmienkach *in vitro* zodpovedajú hodnotám dosiahnutým pri 48 hodinách fermentácie v bachore vrecúškovou metódou. Potvrdilo sa to u čistej sulfátovej celulózy, ktorá bola na 90 % i viac strávená pri 48 hodinách fermentácie v bachore, čo je v súlade s údajmi Pfandera a i. (1966) a Mellenbergera a i. (1970). Pri metóde *in vitro* bolo 90 % i viac strávenej celulózy až pri 96 hodinách fermentácie. Kompletnému tráveniu celulózy pri tejto metóde bráni nahromadená mikrobiálna bunečná masa a kyslé vedľajšie produkty, ktoré sú výsledkom fermentácie substrátu. Výhodou vrecúškovej metódy oproti metóde *in vitro* je:

- a) substrát je v styku s celým obsahom bachora (pri metódach *in vitro* je používaný len malý objem bachorovej šťavy),
- b) malá možnosť straty aktivity bachorových mikroorganizmov (Aerts a De Brabander, 1977).

Dostatočná stráviteľnosť (46,8 a 45,4 %) bola zistená aj u jačmennej slamy pri 48-hodinovej fermentácii v bachore, keďže maximálna preňu je 48 % stráviteľnosť (A p a l o v i č a D o š k o v á, 1977). P e a r c e a i. (1979) zistili 45,3% stráviteľnosť jačmennej slamy pri 48-hodinovej fermentácii v bachore vrecúškovou metódou, čo je v súlade s našimi výsledkami.

Neupravené bukové piliny neboli fermentačnou aktivitou bachorovej mikroflóry ovplyvnené, pretože sa ich stráviteľnosť so stúpajúcou dobou fermentácie nemenila. Príčinou je lignín, ktorý je viazaný pevnými väzbami na drevné polysacharidy, čím zabraňuje ich využitiu bachorovou mikroflórou. Lignínové polyméry sú chemicky stabilné štruktúry, ktoré môžu byť atakované len aeróbnymi baktériami a hubami. Je preto nepravdepodobné, že lignín môže byť extenzívne depolymerizovaný v anaeróbnych podmienkach zaživiaceho traktu (K e f f o r d, 1958). Nízke hodnoty stráviteľnosti NBP [0,47—3,48 %] sú podobné hodnotám stráviteľnosti dubových pilín [0,85—5,86 %], ktoré zistili A n t h o n y a i. (1969). Skutočnosť, že stráviteľnosť NBP nebola stúpajúcou dobou fermentácie v bachore ovplyvnená, sa prejavila v nízkom korelačnom koeficiente, ktorý je možné pripísať:

a) nízkej stráviteľnosti NBP stanovenej v podmienkach *in vitro* a *in vivo*,

b) štandardnej strednej chybe, ktorá pri vrecúškovej metóde činí 2 až 6 % (P l a y n e a i., 1978) a pri metóde *in vitro* 3 až 5 % (V a n S o e s t a R o b e r t s o n, 1980). Lignocelulózové materiály o vyššej stráviteľnosti *in vitro* sa teda zdajú byť vhodnejšími substrátmi pre testovanie vrecúškovou metódou, o čom svedčia vysoké korelačné koeficienty dosiahnuté pri testovaní spomínaných troch druhov substrátov. C h e n o s t a i. (1970) zistili tento tesný korelačný vzťah pri testovaní 83 rôznych druhov krmív.

Keďže použitie vrecúškovej metódy je značne závislé od kvality materiálu, z ktorého sa vrecúška vyrábajú, je nutné konštatovať, že v tomto pokuse sa ukázal ako najvhodnejší letecký hodváb č. 1 o veľkosti ok 50 μ . A j S t e r n a i. (1978) potvrdili vhodnosť podobného materiálu — dacronu o veľkosti ok 50 μ (oproti 5 μ) na výrobu vrecúšok.

Na záver môžeme konštatovať, že vrecúšková metóda stanovenia stráviteľnosti LCM je vhodnou, porovnateľnou a reprodukovateľnou metódou s fermentačnou metódou *in vitro*, o čom svedčia vysoké korelačné koeficienty (vypočítané z hodnôt stráviteľnosti pri 48-hodinovej fermentácii v bachore a pri 96-hodinovej fermentácii v podmienkach *in vitro*) získané pri testovaní čistej sulfátovej celulózy, jačmennej slamy a upravených bukových pilín. Vrecúšková metóda je pre stanovenie stráviteľnosti neupravených pilín s nízkou stráviteľnosťou (*in vitro*) menej vhodná. V budúcnosti bude potrebné si to overiť testovaním iných druhov neupraveného dreva, avšak s vyššou stráviteľnosťou (osika, javor, ja-seň).

Literatúra

AERTS, J. V. — De BRABANDER, D. L.: Comparison of laboratory methods for predicting the organic matter digestibility of forages. Anim. Feed Sci. Technol., 2, 1977, s. 337-349.

- ANTHONY, W. B. — CUNNINGHAM, J. P. Jr. — HARRIS, R. R.: Hardwood sawdust as feed for ruminants. Adv. Chem. Ser., 95, 1969, s. 315-327.
- APALOVIC, R. — DOŠKOVÁ, E.: Stanovenie stráviteľnosti lignocelulóзовých materiálov. Živočišná Výroba, 22, 1977, s. 673-678.
- BAILEY, C. B. — HIRONAKA, R.: Maximum loss of feed from nylon bags in the rumens of steers as related to apparent digestibility. Can. J. Anim. Sci., 50, 1970, s. 325-330.
- BALCH, C. C. — JOHNSON, C. W.: Factors affecting the utilization of food by dairy cows. 2. Factors influencing the rate of breakdown of cellulose (cotton thread) in the rumen of the cow. Br. J. Nutr., 4, 1950, s. 389-394.
- CHENOST, M. — GREHET, E. — DEMARQUILLY, C. — JARRIGE, R.: The use of nylon bag technique for the study of forage digestion in the rumen and for predicting feed value. Proc. XI Int. Grassl. Congr. Queensland, Australia, 1970, s. 697-701.
- KEFFORD, N. P.: Lignification of plants in relation to ruminant nutrition. J. Aust. Inst. Agr. Sci., 24, 1958, s. 297-304.
- LOWREY, R. S.: The nylon bag technique for the estimations of forage quality. Proc. Natn. Conf. For. Qual. Eval. Util., Lincoln, Nebraska, USA, 1969, s. 1-12.
- MELLENBERGER, R. W. — SATTER, L. D. — MILLETT, M. A. — BAKER, A. J.: An *in vitro* technique for estimating digestibility of treated and untreated wood. J. Anim. Sci., 30, 1970, s. 1005-1011.
- MILES, J. T.: Rumen digestion of crude fibre constituents. J. Dairy Sci., 34, 1951, s. 492-(abs.).
- PEARCE, G. R. — BREAD, J. — HILLIARD, E. P.: Variability in the chemical composition of cereal straws and *in vitro* digestibility with and without sodium hydroxide treatment. Aust. J. exp. Agric. Anim. Husbandry, 19, 1979, s. 350-353.
- PFANDER, W. H. — GREBING, S. E. — HAJNY, G. — TYREE, E.: The value of wood derived products in ruminant nutrition. Adv. Chem. Ser., 95, 1969, s. 298-314.
- PIGDEN, W. J. — HEANEY, D. P.: Lignocellulose in ruminant nutrition. Adv. Chem. Ser., 95, 1969, s. 245-261.
- PLAYNE, M. J. — KHUMNUALTHONG, W. — ESCHEVARRIA, M. G.: Factors affecting the digestion of oesophageal fistula samples and hay samples in nylon bags in the rumen of cattle. J. agric. Sci., 90, 1978, s. 193-204.
- RODRIGUEZ, H.: The *in vivo* bag technique in digestibility studies. Rev. Cubana Cienc. Agric., 2, 1968, s. 77-81.
- SHORT, H. L. — BLAIR, R. M. — SEGELQUIST, Ch. A.: Fiber composition and forage digestibility by small ruminants. J. Wildl. Manage, 38, 1974, s. 197-209.
- STERN, M. D. — SATTER, L. D. — SANTOS, K. A. S. — RODE, L. M.: Effect of pore size of bags on ruminal dry matter and nitrogen disappearance. Joint Meeting of ADSA and ASAS, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA, 1978, s. 69.
- VAN DYNE, G. M.: Micromethods for nutritive evaluating of range forages. J. Range Manage, 15, 1962, s. 303-314.
- VAN KEUREN, R. W. — HEINEMANN, W. W.: Study of a nylon bag technique for *in vivo* estimation of forage digestibility. J. Anim. Sci., 21, 1962, s. 340-345.
- VAN SOEST, P. J. — ROBERTSON, J. B.: Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. Proc.: Standardization of analytical methodology for feeds, Ottawa, Canada, 1980, s. 49-60.

Došlo dňa 20. 4. 1982

ЯЛЧ, Д. — ЗЕЛЕНЯК, И. — БАРАН, М. (Институт физиологии сельскохозяйственных животных САН Кошице): Определение переваримости лигноцеллюлозных материалов по методу найлон бэг. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12): 721-728.

В ходе опытов на баранах определяли переваримость разных лигноцеллюлозных материалов (ЛЦМ) по методу мешочка. Животным скармливали качественное луговое сено вволю и подпускали к воде и минеральной соли для овец. Как показал опыт, переваримость ЛЦМ не зависит от массы субстратной навески, но с продолжительностью ферментации их переваримость повышается. Почти 90% и более сух. вещ. субстратов (чистой сульфатной клетчатки, ячменной соломы и обработанных буковых опилок) переварено в течение 48-часовой ферментации в рубце, что аналогично с 96-часовой их ферментацией *in vitro*. Об этом свидетельствуют высокие коэффициенты корреляции, выведенные из значений перева-

римости субстратов в условиях *ин витро* и *ин vivo*. Исключение составляют необработанные буковые опилки, у которых это высокое отношение не установлено — главное, из-за их малой переваримости. Эти факты требуют еще подтверждения тестами по другим видам необработанной древесины (осина, клен, ясень), но повышенной удобоваримости. Наиболее пригодны мешочки из самолетного шелка размерами около 50 μ .

рубцовая ферментация; солома; клетчатка; буковые опилки; переваримость *ин витро*

JALČ, D. — ZELENÁK, I. — BARAN, M. (Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice): *Determination of the Digestibility of Lignocellulose Materials by the Nylon Bag Method*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 721-728.

A trial was performed on wethers to study the digestibility of various lignocellulose materials (LCM) by the nylon bag method. The animals were fed good meadow hay *ad lib.* with unlimited access to water and mineral lick. The trial showed that LCM digestibility was not influenced by different weights of substrate sample. However, digestibility increased with the time for which the LCM were left to ferment in rumen. Almost 90 % or more dry matter of the different substrates (pure sulphate cellulose, barley straw and treated beech sawdust) was digested within 48-hour fermentation in rumen. The situation is similar when the substrates are left to ferment *in vitro* for 96 hours. The high correlation coefficients calculated from the digestibility values of the substrates *in vitro* and *in vivo* testify to this fact. The only exception is untreated beech sawdust in which no such a high correlation was found, mainly owing to its low digestibility. However, this should be verified in other kinds of untreated wood (aspen, maple, ash), but with a higher digestibility. It should be stated that silk with a 50 μ mesh is the best material for the production of the bags.

rumen fermentation; straw; cellulose; beech sawdust; digestibility *in vivo*

JALČ, D. — ZELENÁK, I. — BARAN, M. (Institut für Physiologie der Haustiere der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Košice): *Bestimmung der Verdaulichkeit von Lignozellulosematerialien durch die Methode nylon bag*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 721-728.

In einem Versuch mit Widdern wurde die Verdaulichkeit von verschiedenen Lignozellulosematerialien (LZM) durch die Beutelmethode verfolgt. Tiere wurden mit gutem Wiesenheu *ad libitum* gefüttert, wobei sie Zugang zu Wasser und Mineral-lysis für Schafe hatten. Der Verlauf des Versuches zeigte, daß die Verdaulichkeit von LZM durch eine unterschiedliche Masse der Aufschüttung des Substrates nicht beeinflusst wurde. Fast 80 % und auch mehr Trockensubstanz von einzelnen Substraten (Reinsulfatzellulose, Gerstestroh und behandelte Buchenspäne) werden bei der 48stündigen Fermentation im Pansen verdaut. Ähnlich verhält es sich auch bei der 96stündigen Fermentation dieser Substrate unter Bedingungen *in vitro*. Es zeugen davon hohe Korrelationskoeffizienten, die aufgrund der Werte der Verdaulichkeit dieser Substrate unter Bedingungen *in vitro* und *in vivo* berechnet wurden. Eine Ausnahme stellen nicht behandelte Buchenspäne dar, bei denen diese hohe Korrelationsbeziehung, vor allem infolge ihrer niedrigen Verdaulichkeit nicht festgestellt wurde. Es wird jedoch nötig sein, diese Tatsache durch die Testung anderer nicht behandelter Holzarten (Espe, Ahorn, Esche) jedoch mit einer höheren Verdaulichkeit zu überprüfen. Man muß konstatieren, daß für die Produktion von Beuteln Flugseide mit der Größe von Maschen 50 μ am geeignetesten ist.

Pansenfermentation; Stroh; Zellulose; Buchenspäne; Verdaulichkeit *in vivo*

Adresa autorov:

MVDr. Dušan Jalč, CSc., MVDr. Imrich Zelenák, CSc., MVDr. Miroslav Baran, CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Palackého 12, 040 01 Košice

VÝSKYT *CRYPTOSPORIDIUM* SP. U NUCENĚ ODPORAŽENÝCH TELAT A PRŮBĚH VYLUČOVÁNÍ OOCYST TOHOTO PRVOKA U TELAT NA DVOU FARMÁCH JIHOČESKÉHO KRAJE

I. Pavlásek

PAVLÁSEK, I. (Parazitologický ústav ČSAV, Praha, pracoviště České Budějovice): *Výskyt Cryptosporidium sp. u nuceně odporažených telat a průběh vylučování oocyst tohoto prvoka u telat na dvou farmách Jihočeského kraje.* Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 729-740.

V období let 1980 až 1981 jsme při orientačním parazitologickém vyšetřování zjistili u 40 % nuceně odporažených telat na jatkách v Českých Budějovicích výskyt kokciidií rodu *Cryptosporidium*. Na dvou farmách Jihočeského kraje (Domanín a Hrdějovice) jsme dále zjišťovali průběh kryptosporidiózních infekcí u telat ve věku od jednoho do třiceti dnů. Oocysty *Cryptosporidium* sp. jsme v trusu přirozeně infikovaných telat detekovali běžnou koprologickou metodou podle Brezy (1957). U telat na obou lokalitách jsme zjistili téměř shodný průběh infekcí. Odlišná technologie ustájení telat po narození neovlivnila výskyt kryptosporidií ani dynamiku jejich vylučování. Oocysty *Cryptosporidium* sp. jsme nacházeli již u čtyřdenních telat. Extenzita infekce postupně narůstala tak, že telata sledovaná na farmě Domanín byla 100% infikována ve věku šest až 12 dnů, na farmě Hrdějovice ve věku sedm až 13 dnů. V dalším období se extenzita infekce snižovala a u telat ve věku 16 až 30 dnů jsme kryptosporidie nezjistili, nebo se vyskytovaly jen velmi sporadicky. Poměrně vysoká intenzita výskytu oocyst kryptosporidií se udržovala od osmého do 13. dne a maximální byla shodně na obou lokalitách desátý den po narození telat, tj. šestý den po objevení se prvních vyloučených oocyst. Prepatentní perioda se pohybovala mezi čtyřmi až sedmi dny, patentní perioda kolísala od osmi do 12 dnů a v průměru trvala deset dnů. Nezjistili jsme výrazný rozdíl v napadení býčků a jaloviček. Prokázali jsme úzkou souvislost mezi průjmy a kryptosporidiózními infekcemi u telat ve věku pět až 14 dnů. U tří nuceně odporažených a tři uhynulých telat jsme zjistili masivní napadení prvokem *Cryptosporidium* sp., což ukazuje na negativní vliv těchto protozoí na celkový zdravotní stav telat a podtrhuje jejich význam i z hlediska ekonomiky odchovu. Infekce se v daných chovech šíří pravděpodobně prostřednictvím oocyst, které jsme v poměrně značném množství nacházeli v podestýlce znečištěné trusem starších nemocných telat. Do velkokapacitního teletníku Stará Hlína mohou zavlékat kryptosporidiózní infekce některá telata svážená ve věku 10 až 14 dnů, čímž lze, kromě dalších faktorů, vysvětlit výskyt průjmů v tomto teletníku sedmý až 14. den po naskladnění.

kryptosporidie; kryptosporidiózní infekce; extenzita infekce; průjmová onemocnění telat; intenzita výskytu oocyst kryptosporidií

Kokciidiím rodu *Cryptosporidium* je v posledním období věnována stále větší pozornost. Přibývá údajů o souvislosti výskytu *Cryptosporidium* sp. s průjmovým onemocněním především u mladých telat. Tento prvok byl zjištěn i u lidí — pacientů, kteří trpěli úpornými průjmy. Přesto, že rod *Cryptosporidium* byl založen Tyzzerem již v roce

1910, podařilo se poprvé prokázat oocysty těchto kokcií v trusu infikovaných koček až Isekim u [1979] u druhu *Cryptosporidium felis*, a to flotační metodou při použití nasyceného roztoku síranu zinečnatého. Zjištění, že trusem infikovaných hostitelů jsou vylučovány do vnějšího prostředí oocysty, usnadňuje diagnostiku tohoto protozoárního onemocnění, která byla až do této doby založena na histologickém vyšetřování tenkého střeva uhynulých a nuceně odporažených zvířat, nebo na barvení seškrabů mukózy ze střevní sliznice metodou podle Giemsy. O průkazu oocyst *Cryptosporidium* sp. v trusu telat při použití různých flotačních roztoků informují Anderson a Bulgin (1981), Heine a Boch (1981) a Pavlásek (1981). Možnost detekce oocyst kryptosporidií v trusu infikovaných telat běžnými koprologickými metodami tak usnadňuje zjišťování, jak jsou tyto infekce v různých chovech rozšířeny, i studium parazita jako takového.

Předložená práce informuje o nálezech kryptosporidií při orientačních vyšetřeních nuceně odporažených telat na sanitních jatkách v Českých Budějovicích a o průběhu vylučování oocyst *Cryptosporidium* sp. u spontánně infikovaných telat na dvou farmách Jihočeského kraje.

MATERIÁL A METODA

A) V období let 1980 až 1981 jsme histologicky nebo metodou seškrabů mukózy ilea vyšetřili 75 nuceně odporažených telat ve věku 10 až 25 dní. K histologickému vyšetření jsme ileum fixovali v AAF (10 ml 40% formolu, 50 ml kyseliny octové ledové, 850 ml absolutního alkoholu), nebo 10% formolem, běžným způsobem zalili do parafínu a řezy silné 5 až 6 μ m jsme barvili vlhkou metodou podle Giemsy. Seškraby střevní mukózy jsme fixovali na podložním sklíčku absolutním metanolem a barvili metodou podle Giemsy.

B) Průběh vylučování oocyst *Cryptosporidium* sp. jsme sledovali u osmi spontánně infikovaných telat na farmě Domanín a u 12 telat na farmě Hrdějovice.

Farma Domanín: Po porodu jsou telata ustájena v individuálních železných klecích asi 40 cm nad úrovní betonové podlahy. Klece jsou umístěny v profylaktoriu mimo vlastní porodnu. Stele se slámou.

Farma Hrdějovice: Po narození zůstávají některá telata určitou dobu na stání s matkou (pokud matka tele dobře snáší), většinou jsou však krátce po porodu vazně ustájena ve vymezeném prostoru podél jedné strany čtyřřadého kravína. Ustájení je na podestýlce. Není zamezen vzájemný kontakt sousedních telat.

Sledovaným skupinám telat jsme od narození asi do 30 dnů věku odebírali denně mezi 9.00 až 11.00 hodinou individuálně rektálně trus a vyšetřovali jsme jej metodou podle Brezy (1957). Intenzitu výskytu oocyst kryptosporidií v 1 g trusu normální konzistence nebo v 1 ml tekutých výkalů (při průjmech) jsme hodnotili při 1000násobném zvětšení mikroskopem pomocí křížků takto:

- + — ojedinelé oocysty v celém nativním preparátu,
- ++ — jedna až dvě oocysty v jednom zorném poli mikroskopu,
- +++ — tři až šest oocyst v jednom zorném poli mikroskopu,
- ++++ — více než šest oocyst v jednom zorném poli mikroskopu.

VÝSLEDKY

VÝSLEDKY ORIENTAČNÍCH VYŠETŘENÍ VZORKŮ ILEA NUCENĚ ODPORAŽENÝCH TELAT

Kryptosporidiózní infekce jsme z celkového počtu 75 telat zjistili u 30, což představuje 40,0 %. Ve většině případů byla jako důvod nucené porážky telete označována veterinárními lékaři gastroenteritida. Různá

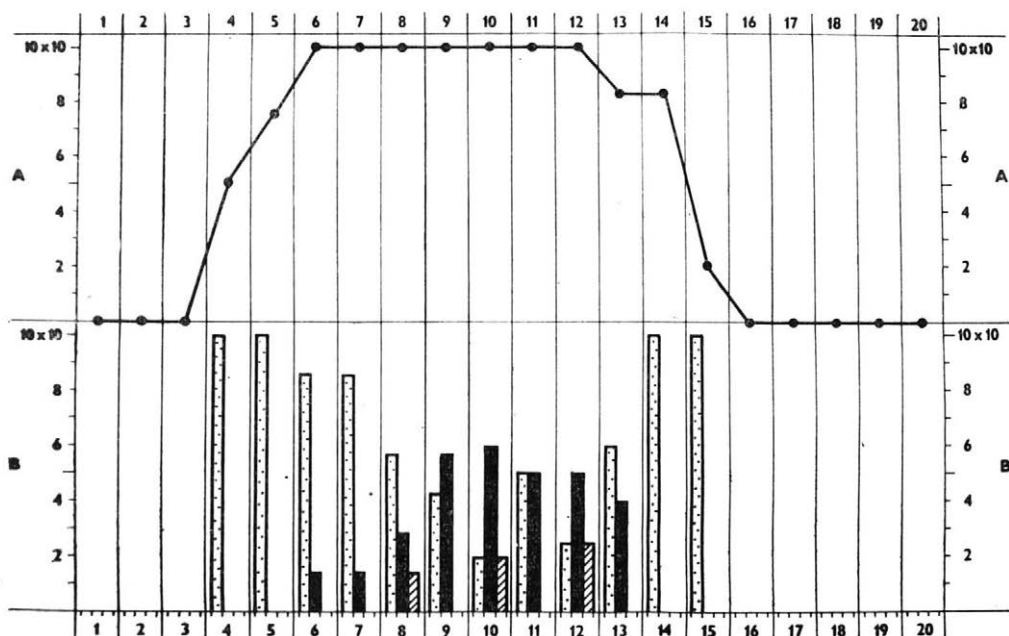
vývojová stadia *Cryptosporidium* sp. o velikosti 2 až 5 μ jsme nacházeli na povrchu klků ilea při histologickém vyšetřování i na roztěrech seškrabů mukózy střevní sliznice.

PRŮBĚH VYLUČOVÁNÍ OOCYST *CRYPTOSPORIDIUM* SP. U SPONTÁNNĚ INFIKOVANÝCH TELAT

1. Farma Domanín

Výsledky průběhu vylučování oocyst kryptosporidií u telat na této farmě jsou znázorněny na obr. 1. Z grafu je zřejmé, že ve věku čtyř dnů vylučovalo oocysty *Cryptosporidium* sp. již 50 % sledovaných telat, pátý den 75 % a šestý den po narození byla skupina osmi telat infikována kryptosporidiemi 100%. Stoprocentní extenzita infekce se udržovala dalších šest dnů. Třináctidenní a čtrnáctidenní telata vylučovala oocysty v 83,3 %. 15. den se extenzita infekce prudce snížila a u šestnáctidenních až dvacetidenních telat jsme oocysty kryptosporidií nezjistili.

Intenzita výskytu oocyst kryptosporidií měla [jak je z obr. 1 patrné] podobný charakter jako extenzita infekce. V trusu čtyřdenních a pětidenních telat jsme nacházeli oocysty tohoto prvoka ojediněle a jejich intenzitu jsme hodnotili jedním křížkem. Šestý a sedmý den po narození jsme intenzitu vylučovaných oocyst kryptosporidií hodnotili shodně jedním křížkem u 85,7 % a dvěma křížky u 14,3 % telat. K výraznému zvýšení intenzity výskytu oocyst kryptosporidií v trusu vyšetřovaných telat došlo ve věku osm až 12 dnů, s maximem desátý den po na-



1. Dynamika vylučování oocyst *Cryptosporidium* sp. v trusu telat na farmě Domanín — The dynamics of the excretion of the oocysts of *Cryptosporidium* sp. in the faeces of calves on the Domanín farm

I. Průběh vylučování oocyst *Cryptosporidium* sp. v trusu býčků a jaloviček — The course of the excretion of the oocysts of *Cryptosporidium* sp. in the faeces of bullocks and heifers

Farma	Číslo telete	Pohlaví	Období vylučování oocyst (věk telat — dny)		Celková doba vylučování oocyst (dny)
			od	do	
Domanín	1	♂	6	7	2 (úhyn)
	2	♂	5	14	10
	3	♂	4	14	11
	4	♂	6	14	9
	průměr		5,2	14	10
	5	♀	4	14	11
	6	♀	4	15	12
	7	♀	4	10	7
	8	♀	4	12	9
	průměr		4	12,75	9,75
Hrdějovice	1	♂	6	14	9
	2	♂	4	15	12
	3	♂	5	14	10
	4	♂	6	14	9
	5	♂	6	13	8
	6	♂	5	6	2 (úhyn)
	průměr		5,3	14,0	9,6
	7	♀	5	12	8 (úhyn)
	8	♀	5	15	11
	9	♀	5	15	11
	10	♀	7	13	7
	11	♀	5	16	12
	12	♀	7	13	7
	průměr		5,6	14,4	9,6

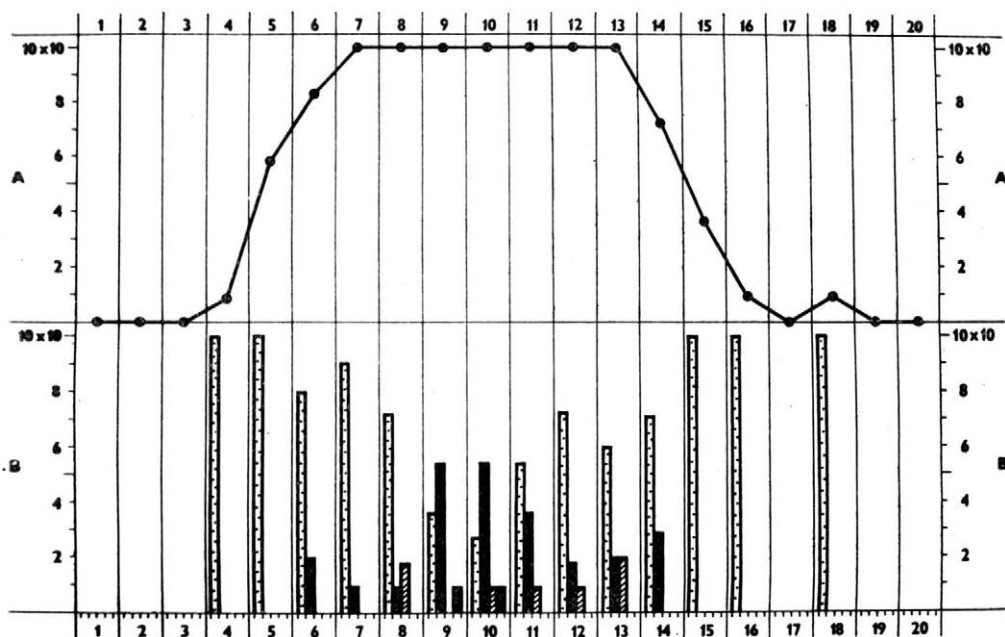
rození. V souladu s extenzitou infekce se od 13. dne věku telat počet vylučovaných oocyst snižoval.

V tab. I uvádíme údaje o době vylučování oocyst *Cryptosporidium* sp. u býčků a jaloviček. Býčci vylučovali oocysty kryptosporidií od pá-tého do 14. dne věku. Průměrná patentní perioda byla deset dnů, mini-mální devět, maximální jedenáct dnů. Jeden býček se silným vodnatým průjmem a intenzitou výskytu oocyst hodnocenou čtyřmi křížky uhynul ve věku osmi dnů.

Jalovičky začaly vylučovat první oocysty *Cryptosporidium* sp. již čtvrtý den po narození. Průměrná patentní perioda byla u nich 9,7 dne, minimální 7, maximální 12 dnů.

2. Farma Hrdějovice

Výsledky průběhu vylučování oocyst kryptosporidií u přirozeně infikovaných telat na této farmě jsou uvedeny na obr. 2. První oocysty jsme nacházeli u čtyřdenních telat (8,3 %). Pátý den po narození byla extenzita infekce 58,2 %, šestý den 83,3 % a od sedmého do 13. dne věku jsme oocysty kryptosporidií zjišťovali u všech vyšetřovaných telat sledované skupiny. 14. den byla extenzita infekce 72,7 %, 15. den došlo k prudkému poklesu (na 36,3 %), 16. den byla extenzita infekce 9,1 % a 17. den věku telat byl výsledek koprologického vyšetřování negativní. U jednoho býčka, který měl po celou dobu sledování velmi těžký průběh onemocnění s masívním výskytem oocyst kryptosporidií po dobu



2. Dynamika vylučování oocyst *Cryptosporidium* sp. v trusu telat na farmě Hrdějovice — The dynamics of the excretion of the oocysts of *Cryptosporidium* sp. in the faeces of calves on the Hrdějovice farm

Vysvětlivky k obr. 1 a 2:

vodorovná osa: věk telat (dny)

svislá osa: A . . . extenzita infekce *Cryptosporidium* sp. (%)

B . . . intenzita výskytu oocyst *Cryptosporidium* sp. (%) hodnocená:



+



++



+++



++++

tří až čtyř dnů, jsme ještě 18. den po narození nacházeli ojedinělé oocysty ve výkalech. V dalších dnech jsme však již v trusu sledované skupiny telat oocysty tohoto prvoka nenalezli.

Také na této farmě měl průběh intenzity výskytu oocyst kryptosporidií podobný charakter jako extenzita infekce. V souladu se vzrůstající extenzitou infekce se s přibývajícím věkem telat zvyšoval i počet vylučovaných oocyst tak, že maximální vrchol jsme zjistili desátý den věku telat (obr. 2). Přitom jsme hodnotili 27,3 % vyšetřených vzorků trusu telat jedním křížkem, 54,5 % dvěma křížky, 9,1 % shodně třemi a čtyřmi křížky. Poměrně značný počet vylučovaných oocyst jsme nacházeli až do 13. dne věku telat, v dalším období intenzita prudce poklesla a ve standardizovaných vzorcích vyšetřovaného trusu jsme nacházeli oocysty pouze ojediněle.

V tab. I uvádíme průběh vylučování oocyst kryptosporidií v závislosti na pohlaví telat. U býčků jsme první oocysty našli v průměrném věku pět dnů a vylučovány byly průměrně po dobu devíti dnů, tj. do průměrného věku 14 dnů. Minimální patentní perioda byla osm, maximální 12 dnů. Jalovičky vylučovaly oocysty *Cryptosporidium* sp. od 5,6 do 14,4 dne. Průměrná patentní perioda byla 9,6 dne, minimální 7, maximální 12 dnů.

Všeobecně lze uvést, že v době našich sledování téměř každé tele na obou farmách prodělalo průjem. Dynamika průjmů na farmě Hrdějovice:

věk telat (dny)	6	7	8	9	10	11	12	13	14
výskyt průjmů (%)	40,0	45,4	45,4	63,6	36,3	27,3	27,3	—	—

3. Výsledky jednorázových orientačních vyšetření telat na přítomnost oocyst *Cryptosporidium* sp.

Výsledky těchto vyšetřování jsou uvedeny v tab. II. V souladu se zjištěnou dynamikou vylučování oocyst *Cryptosporidium* sp. u spontánně infikovaných telat je i z těchto šetření zřejmé, že telata byla tímto prvokem infikována od čtvrtého dne věku a od šestého do dvanáctého dne po narození byla všechna napadena kryptosporidiemi. Sporadický výskyt jsme zaznamenali u telat ve věku od 20 do 24 dnů.

V tab. III uvádíme průběh vylučování oocyst *Cryptosporidium* sp. u dvou jaloviček, které byly ve věku 12 dnů převedeny do velkokapacitního teletníku Stará Hlína z farmy Domanín. Maximální výskyt oocyst kryptosporidií jsme u obou jaloviček zjistili čtvrtý den jejich pobytu ve VKT (ve věku 15 dnů). Během dalších dvou dnů intenzita výskytu oocyst silně poklesla a od 18. dne věku jaloviček byl výsledek vyšetřování na kokcidie rodu *Cryptosporidium* negativní.

DISKUSE

Výzkumu kryptosporidiózních infekcí, především u hospodářsky nejvýznamnějších druhů zvířat, je v posledním období věnována značná pozornost. V literatuře je výskyt těchto prvoků velmi často uváděn v souvislosti s průjmy u telat (Meuten aj., 1974; Pohlenz aj., 1973; Nagy aj., 1979; Tzipori aj., 1980). Vzhledem k tomu, že i našemu

II. Extenzita infekce *Cryptosporidium* sp. u telat různého věku na farmě Domanín a Hrdějovice — The extensity of infection with *Cryptosporidium* sp. in the calves of different age on the Domanín and Hrdějovice farms

Věk telat (dny)	Domanín			Hrdějovice		
	počet vyšetřo- vaných telat	počet pozitiv- ních telat	extenzita infekce (%)	počet vyšetřo- vaných telat	počet pozitiv- ních telat	extenzita infekce (%)
2	7	0	—	2	0	—
3	7	0	—	2	0	—
4	8	4	50,00	7	1	14,29
5	8	6	75,00	12	7	58,33
6	9	9	100,00	12	10	83,33
7	7	7	100,00	12	12	100,00
8	11	11	100,00	12	12	100,00
9	13	13	100,00	12	12	100,00
10	13	13	100,00	12	12	100,00
11	7	7	100,00	12	12	100,00
12	11	11	100,00	13	13	100,00
13	15	14	93,33	12	12	100,00
14	17	13	76,47	12	9	75,00
15	14	6	42,86	14	5	35,71
16	15	4	26,67	13	2	15,38
17	11	4	36,36	14	3	21,43
18	10	3	30,00	14	4	28,57
19	8	3	37,50	13	2	15,38
20	6	1	16,67	13	1	7,69
21	6	0	0,00	12	2	12,50
22	5	2	40,00	10	2	20,00
23	4	1	25,00	9	2	22,22
24	3	0	0,00	8	1	12,50
25	2	0	0,00	8	0	0,00

III. Průběh vylučování oocyst *Cryptosporidium* sp. v trusu dvou jaloviček dovezených z farmy Domanín do velkokapacitního teletníku Stará Hlína — The course of the excretion of the oocysts of *Cryptosporidium* sp. in the faeces of the heifers transported to the Stará Hlína large calf house from the Domanín farm

Evidenční číslo telete	Pohlaví	Věk telat (dny)							
		12	13	14	15	16	17	18	19
91410	♀	—	+	++	++++	+	+	—	—
91412	♀	+	+	+	+++	+	+	—	—

socialistickému zemědělství způsobují průjmová onemocnění telat značné ekonomické ztráty, je třeba tuto problematiku řešit v celém komplexu, tedy i z hlediska parazitologického.

Systematickým vyšetřováním se nám podařilo zjistit v trusu spontánně infikovaných telat oocysty kokcií rodu *Cryptosporidium* (Pavlásek, 1981) běžnou flotačně centrifugační metodou podle Brezy (1957). Poprvé jsme oocysty tohoto prvoka detekovali u dvou jaloviček z farmy Domanín, které byly naskladněny ve věku 12 dnů do velkokapacitního teletníku Stará Hlína. Na základě tohoto zjištění jsme sledovali dynamiku vylučování oocyst *Cryptosporidium* sp. u telat ve věku 1–30 dní na farmě Domanín a Hrdějovice. Tyto farmy se liší způsobem ustájení telat po narození.

Z dosažených výsledků vyplývá, že oocysty *Cryptosporidium* jsme v trusu přirozeně infikovaných telat nacházeli shodně na obou lokalitách již čtvrtý den po narození. Patentní perioda byla osm až dvanáct dní, v průměru činila u obou sledovaných skupin telat deset dnů. Z výsledků denního sledování telat na obou farmách je možné vyvodit i délku prepatentní periody (4–7 dnů), i když jsme si vědomi toho, že ji nelze určit přesně na základě přirozených infekcí. Naše výsledky potvrzují pozorování, o kterých referovali Moon a Bemrick (1981). Tito autoři uvádějí, že v trusu infikovaných telat nacházeli kryptosporidie (metodou barvených preparátů podle Giemsy) v průměru po dobu deseti dnů a že čtvrtý den po inokulaci detekovali kryptosporidie a leze v ileu. Podobně i Heine a Boch (1981) uvádějí délku patentní periody jeden až dva týdny, prepatentní periodu čtyři až šest dnů.

Zjistili jsme, že na sledovaných lokalitách byla telata ve věku 6 až 12 dnů infikována kryptosporidii 100%. Od 13. až 14. dne věku telat extenzita infekce velmi prudce klesala. V dalším období jsme oocysty *Cryptosporidium* sp. u sledovaných telat již nenacházeli, nebo pouze velmi sporadicky. Nemůžeme však zcela vyloučit možnost pozitivních nálezů ještě v průběhu dalšího období. Ojedinelé oocysty kryptosporidií jsme např. zjistili u tří telat ve věku 26 až 30 dní, ačkoliv od 15. dne po narození byl u nich výsledek denního vyšetřování negativní. Toto zjištění je v souladu s výsledky histologických vyšetřování ilea i seškra-bů mukózy střevní sliznice u telat nuceně odporažených na jatkách v Českých Budějovicích, jejichž průměrný věk činil 15 dnů a u kterých byla extenzita infekce 40%.

Nejvyšší intenzitu výskytu oocyst kryptosporidií jsme v trusu telat zjišťovali třetí až pátý den potom, co jsme u nich našli první vyloučené oocysty. Při masivních infekcích jsme nacházeli v trusu některých telat s průjmy oocysty, které měly mírně ledvinovitý tvar, jiné měly v místě prohlubně jakýsi tupý kuželovitý výběžek. Domníváme se, že je velmi pravděpodobné, že námi zjištěný útvar na povrchu některých oocyst kryptosporidií v trusu vyšetřovaných telat může být částí přichycovacího orgánu, který se hned na začátku vyvíjí v koncové oblasti trofozoitu. Není dále vyloučeno, že se při silných infekcích odlupují s povrchu střevních klků do lumina ještě ne zcela zralé oocysty i s různými rezidui na povrchu svých stěn, které jsou součástí parazitoforní vakuoly mikrokliku, nebo dokonce i jednotlivá vývojová stadia tohoto prvoka. Trusem infikovaných telat odchází v uvedeném období značné množství oocyst, které zamořují vnější prostředí, čímž lze vysvětlit velmi rychlé šíření infekce na obou sledovaných lokalitách. Pro ilustraci

uvádíme jeden z příkladů na farmě Hrdějovice. Krátce po narození bylo tele ustájeno na podestýlku, ve které jsme upravenou flotační metodikou zjistili přítomnost oocyst *Cryptosporidium* sp. První oocysty jsme potom v jeho trusu zjistili pátý den po narození. Z toho je tedy možné odvodit, že v takovýchto provozních podmínkách se kryptosporidiózní infekce šíří pozřením infekceschopných oocyst již krátce po narození telete prostřednictvím krmiva, olizováním různých okolních předmětů a sousedních telat (většinou věkově starších), což je u telat v prvních dnech jejich života vrozený instinkt.

Na obou sledovaných lokalitách jsme zjišťovali shodný vývoj kryptosporidiózních infekcí přesto, že technologie odchovu telat na farmě Domanín je založena na individuálním způsobu ustájení v klecích bezprostředně po porodu. Znamená to tedy, že se kryptosporidie mohou šířit mezi telaty i v těchto podmínkách, pokud nejsou dodrženy zásady správné zoohygieny.

Z hlediska epizootologického je rovněž závažné zjištění, že jsme kryptosporidiózní infekce zjistili i ve velkokapacitním teletníku Stará Hlína. Z výsledků našich jednorázových orientačních vyšetření telat v této souvislosti dále vyplývá, že 10–14denní telata, což je věk, který je považován z nejrůznějších hledisek za optimální pro jejich svoz do VKT, byla infikována kryptosporidii ve 100 % až 76,5 %. Proto některá průjmová onemocnění, která se objevují v tomto VKT v prvním týdnu po naskladnění, lze přičíst vedle mnoha jiných faktorů na vrub i těmto protozoárním infekcím.

Podobně jako již někteří citovaní autoři jsme i my prokázali ve sledovaných chovech souvislost výskytu kryptosporidiózních infekcí s průjmovým onemocněním telat ve věku od pěti do 14 dnů. Rovněž fakt, že kryptosporidiózní telata, která byla během našeho sledování odvezena na nucenou porážku (3 ks) nebo uhynula (3 ks), podtrhuje význam těchto protozoí. Vzhledem k tomu, že podle některých literárních údajů existují velmi těsné asociace mezi kryptosporidii, různými bakteriemi, koronaviry i rotaviry, je velmi obtížné určit, který z těchto agens je při průjmových onemocněních prvotní a který druhotný. Na základě studia povrchových struktur ilea napadeného kryptosporidii (pomocí rastrovací elektronové mikroskopie) si však dovoluujeme uvést, že vývojová stadia tohoto prvoka narušují, a tak pravděpodobně snižují, funkci resorpčního epitelu střeva vlivem silné atrofie klků a zanechávají po sobě jakési prohloubeniny, „rány“. Velmi často dochází rovněž ke značnému odlupování epitelů. Tím mohou tyto parazité vytvářet vstupní bránu pro různé patogenní zárodky, proti kterým je tele v prvních deseti dnech života téměř bezbranné. Svou činností by potom mohly být kryptosporidie primárním faktorem průjmových onemocnění telat ve věku od pěti do 14 dnů. Vzhledem k tomu, že jde o velmi závažnou otázku, bude třeba řešit tuto problematiku systematicky v celé šíři.

Literatura

- ANDERSON, B. C. — BULGIN, M. S.: Enteritis caused by *Cryptosporidium* in calves. Vet. Med./Small Anim. Clin., 1981, s. 865–868.
BREZA, M.: Niekoľko praktických poznatkov a námetov k helmintologickej diagnostike. Helminológia, SAV, 1957, č. 1, s. 57–63.

HEINE, J. — BOCH, J.: Kryptosporidien-Infektionen beim Kalb. Nachweis, Vorkommen und experimentelle Übertragung. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 94, 1981, s. 289-292.

ISEKI, M.: *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. Jap. J. Parasit., 28, 1979, s. 295-307.

MEUTEN, P. J. — KRUININGEN, M. J. — LEIN, D. H.: Cryptosporidiosis in a calf. S. Am. vet. med. Ass., 165, 1974, s. 914-917.

MOON, H. W. — BEMRICK, W. J.: Fecal transmission of calf cryptosporidia between calves and pigs. Vet. Pathol., 18, 1981, s. 248-255.

NAGY, B. — ANTAL, A. — RATZ, F.: A borjak cryptosporidiosisank magyarországi előfordulása. Magy. Állatorv. Lap., 34, 1979, s. 585-588.

PAVLÁSEK, I.: Paraziti telat ve velkochovech. In: Zbor. z V. celoštátnej konferencie „Produkcia a zdravie teliat v priemyselných podmienkach chovu“. 1981, s. 152-156.

PAVLÁSEK, I.: První nález oocyst *Cryptosporidium* sp. v trusu telat. Folia parasitol., 29, 1982, s. 115-118.

POHLENZ, J. — MOON, H. W. — CHEVILLE, N. F. — BEMRICK, W. J.: Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhoea of calves. J. Am. vet. med. Ass., 172, 1978, s. 452-457.

TZIPORI, S. — ANGUS, K. W. — CAMPBELL, I. — GRAY, E. W.: Cryptosporidium: Evidence for a single-species genus. Infect. Immun., 30, 1980, s. 884-886.

Došlo dne 21. 5. 1982

ПАВЛАСЕК, И. (Институт паразитологии при АН ЧССР, Прага, рабочий объект Ч. Будейовице): *Cryptosporidium* sp. у вынужденно забитых телят и выделение его ооцист в двух телятниках Южночешской области. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 729-740.

В период 1980—81 гг. в ходе ориентировочного паразитологического исследования у 40 % вынужденно забитых телят обнаружили кочидии рода *Cryptosporidium* sp. На фермах Доманин и Грдейовице прослеживали динамику криптоспориозных заражений у телят в возрасте 1—30 дней. Ооцисты устанавливали в фекалиях обычным копрологическим методом Брезы (1957). Инфекция протекала в этих двух объектах почти одинаково, и разная технология содержания не отражалась ни на проценте, ни на динамике выделения ооцист, которое отмечено уже у 4-дневных телят. Экстенсивность заражения возрастала вплоть до 100 % в Доманине у телят в возрасте 6—12 дней, и в Грдейовицах — в возрасте 7—13 дней. Позднее этот процент снижался, и в 16—30-дневном возрасте криптоспорииды уже не встречались или же спорадически. Сравнительно сильная их интенсивность сохранялась в пределах 8—13 дней с максимумами на 10-й день жизни телят, т. е. на 6-й день после первых выделений. Препатентный период имел место между 4—7 днями, а патентный — между 8—12 днями и длился около 10 дней. Заметных различий между поражением бычков и телочек не отмечено. Доказано тесное отношение между поносами и криптоспориозными инфекциями в возрасте 5—14 дней. У 3 вынужденно забитых и 3 погибших телят установлено интенсивное заражение этим простейшим, что доказывает его опасность и для экономики разведения. Инфекция распространяется в этих фермах, вероятно, посредством ооцист, которые часто встречаются и в загрязненной подстилке под старшими больными телятами. В крупный телятник Стара Глина криптоспорииды могут занести попадающие сюда телята в возрасте 10—14 дней, чем (помимо прочих факторов) можно объяснить распространение здесь поносов на 7—14 день после заполнения телятника.

криптоспорииды; экстенсивность заболевания; поносы; интенсивность распространения ооцист криптоспориид

PAVLÁSEK, I. (Institute of Parasitology, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha, Station České Budějovice): The Occurrence of *Cryptosporidium* sp. in Emergency-Slaughtered Calves and the Course of Excretion of the Protozoan Oocysts in Calves on Two Farms in the South Bohemian Region. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 729-740.

In the 1980—1981 period, preliminary parasitological examination revealed the occurrence of coccidia of the *Cryptosporidium* genus in 40 % of the calves emergency-slaughtered in the České Budějovice slaughterhouse. Further, the course of

Cryptosporidium infections was studied in the calves from one to thirty days of age on two farms in the South Bohemian region (Domanín, Hrdějovice). The oocysts of *Cryptosporidium* sp. were detected by the current coprological method after Breza (1957) in the faeces of naturally infected calves. The infections had almost the same course in the calves on both farms. The different calf housing systems after birth had no influence on the occurrence of Cryptosporidia and on the course of their excretion. The oocysts of *Cryptosporidium* sp. were already found in four days old calves. The extensity of infection gradually increased so that 100 % of the calves studied on the Domanín farm were infected at the age of six to twelve days and on the Hrdějovice farm at the age of seven to fourteen days. Later the extensity of infection decreased and the 16 to 30 days old calves harboured no Cryptosporidia or the occurrence of the microorganism was just sporadic. A comparatively high intensity of the occurrence of Cryptosporidium oocysts was maintained from the eighth to the 13th day and the maximal level was recorded on both farms on the tenth day from the birth of the calves, i. e. the sixth day from the time when the first excreted oocysts were observed. The prepatent period ranged between four and seven days, the patent period from eight to twelve days, and the average duration was ten days. No expressive difference in infection was found between bullocks and heifers. A close relationship was demonstrated between diarrhoeas and cryptosporidial infections in calves from five to 14 days of age. Mass infection with the protozoan *Cryptosporidium* sp. was found in three emergency-slaughtered calves and in three calves which had died. This suggests that these protozoans had an adverse effect on the over-all health condition of the calves and that their importance is high also in view of the economy of rearing. In the given herds, infection probably spreads through the oocysts which were found in comparatively large quantities in the litter contaminated with the faeces of older diseased calves. The Cryptosporidium infections may be introduced in the Stará Hlína large calf house by the calves transported there at the age of 10 to 14 days; among other factors, this may serve for the explanation of the occurrence of diarrhoeas in this calf house the seventh to 14th days from the housing of the calves.

Cryptosporidia; *Cryptosporidium* infections; extensity of infection; diarrhoeas in calves; intensity of the occurrence of *Cryptosporidium* oocysts

PAVLÁSEK, I. (Institut für Parasitologie der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Praha, Arbeitsstelle České Budějovice): *Vorkommen von Cryptosporidium* sp. bei gezwungen geschlachteten Kälbern und Verlauf der Ausscheidung von Oozysten dieses Einzellers bei Kälbern auf zwei Farmen des Südböhmischen Bezirkes. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 729-740.

In den Jahren 1980 bis 1981 wurde bei einer parasitologischen Orientierungsuntersuchung bei 40 % der gezwungen geschlachteten Kälber im Schlachthaus in České Budějovice das Vorkommen von Kokzidien der Gattung *Cryptosporidium* festgestellt. Auf zwei Farmen des Südböhmischen Bezirkes (Domanín und Hrdějovice) stellten wir weiter den Verlauf von kryptosporidialen Infektionen bei Kälbern im Alter von 1 bis 30 Tagen fest. Die Oozysten von *Cryptosporidium* sp. enthüllten wir im Exkrement von natürlich infizierten Kälbern durch die übliche koprologische Methode nach Breza (1957). Bei Kälbern auf den beiden Lokalitäten stellten wir einen fast übereinstimmenden Verlauf der Infektionen fest. Eine unterschiedliche Technologie der Stallhaltung von Kälbern nach der Geburt beeinflusst weder das Vorkommen von Kryptosporidien noch die Dynamik ihrer Ausscheidung. Die Oozysten von *Cryptosporidium* sp. fanden wir bereits bei viertägigen Kälbern. Die Extensität der Infektion erhöhte sich allmählich auf solche Weise, daß die auf der Farm Domanín verfolgten Kälber hundertprozentig im Alter von sechs bis zwölf Tagen infiziert wurden (auf der Farm Hrdějovice im Alter von sieben bis dreizehn Tagen). Im weiteren Zeitraum sank die Extensität der Infektion und bei Kälbern im Alter von 16 bis 30 Tagen wurden keine Kryptosporidien festgestellt, oder sie kamen sehr sporadisch vor. Eine verhältnismäßig hohe Intensität des Vorkommens von Oozysten der Kryptosporidien erhielt sich vom 8. bis zum 13. Tag und eine maximale Intensität wurde übereinstimmend auf beiden Lokalitäten am zehnten Tag nach der Geburt von Kälbern ermittelt, das heißt am sechsten Tag nach der Erscheinung der ersten ausgeschiedenen Oozysten. Die präpatente Periode bewegte sich zwischen vier bis sieben Tagen, die patente Periode schwankte

von acht bis 12 Tagen und im Durchschnitt dauerte sie zehn Tage. Man stellte keinen deutlichen Unterschied im Befall von Jungbullen und Jungsäuen fest. Es wurde ein enger Zusammenhang zwischen Durchfällen und kryptosporidiosis Infektionen bei Kälbern im Alter von fünf bis 14 Tagen nachgewiesen. Bei drei gezwungen abgeschlachteten und drei eingegangenen Kälbern wurde ein massiver Befall durch den Einzeller *Cryptosporidium* sp. festgestellt, was auf den negativen Einfluß dieser Protozoen auf den gesamten Gesundheitszustand von Kälbern hinweist und ihre Bedeutung auch vom Gesichtspunkt der Ökonomik der Aufzucht aus unterstreicht. Die Infektion verbreitet sich in den gegebenen Züchten wahrscheinlich mittels der Oozysten, die in einer verhältnismäßig beträchtlichen Menge in der durch den Exkrement von älteren kranken Kälbern verunreinigten Streu gefunden wurden. Im Kälberstall mit großer Kapazität Stará Hlína können die kryptosporidiosis Infektionen einige Kälber, die im Alter von 10 bis 14 Tagen konzentriert werden, verbreiten, wodurch man, außer den weiteren Faktoren das Vorkommen von Durchfällen in diesem Kälberstall am siebenten bis vierzehnten Tag nach der Einstallung erklären.

Kryptosporidien; kryptosporidiosis Infektionen; Extensität der Infektion; Durchfallerkrankung von Kälbern; Intensität des Vorkommen von Oozysten der Kryptosporidien

Adresa autora:

Ing. Ivan Pavlásek, CSc., Parazitologický ústav ČSAV, Na sádkách 702, 370 05 České Budějovice

ZMENY POČTU T A B LYMFOCYTOV V KRVI PRASÍAT PO EXPERIMENTÁLNEJ ASKARIDÓZE

Z. Borošková, M. Benková, R. Alexander

BOROŠKOVÁ, Z. — BENKOVÁ, M. — ALEXANDER, R. (Helmintologický ústav SAV, Košice): *Zmeny počtu T a B lymfocytov v krvi prasiat po experimentálnej askaridóze*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 741-746.

Sledovali sme zmeny počtu T a B dependentných buniek v periférnej krvi po experimentálnom invadovaní prasiat (pri živej hmotnosti 8—10 kg) vajčkami *Ascaris suum* (50 000 vajčiek na prasa). Pri detekcii obidvoch bunkových populácií dvoma rozetovými metódami (E a EAC) sa ukázalo, že ich prvý vzostup je v treťom dni po invadovaní. Maximum výskytu T a B buniek sme zaznamenali v 17. dni po invadovaní, v 20. dni ich počet klesol na východiskové hodnoty. Súčasne sme u experimentálnych zvierat sledovali bielu zložku krvného obrazu. Medzi výsledkami hematologických sledovaní sme pozorovali priamu závislosť s výsledkami rozetových metód. Z pozorovaní vyplýva, že u špecifického hostiteľa začína vnímavosť T a B lymfoidných buniek na antigénny signál už v ranej fáze invázie.

ošípaná; *Ascaris suum*; experimentálna invázia; rozetové testy; T a B lymfoidné bunkové populácie

Kým otázka humorálnych protilátok pri experimentálnej askaridóze špecifického a nešpecifického hostiteľa bola relatívne uspokojivo vyriešená mnohými autormi (Polujektovová, 1972; Poletajevová, 1978; Nakasato, 1974), imunocelulárne aspekty pri tejto helmintóze sú málo prebádané. K doterajším poznatkom o distribúcii T a B lymfocytov v imunokompetentných orgánoch prispelo v poslednej dobe zdokonalenie metód, ktoré umožňujú študovať imunitné reakcie pri helmintózach, teda aj pri askaridóze na celulárnej úrovni. Veľký význam v tomto smere získali najmä rozetové metódy, pomocou ktorých môžeme rozlíšiť dve hlavné (T a B) lymfocytárne populácie na základe ich rôznych membránových receptorov. Existuje mnoho variantov a modifikácií pôvodných rozetových metód. V helmintológii sú známe len ojedinelé práce, pri ktorých sa tieto metódy používali na stanovenie distribúcie B dependentných lymfocytov v imunokompetentných lymfoidných orgánoch, a to pri askaridóze nešpecifického hostiteľa (Khouri a Soulsby, 1977a,b; Poletajevová, 1978). U špecifických hostiteľov — prasiat — sa dynamika týchto dvoch populácií imunokompetentných buniek pomocou rozetových testov zatiaľ neskúmala.

Práca je orientovaná na štúdium imunogénneho vplyvu experimentálnej askaridózy ošípaných na zmeny počtu T a B lymfocytov v krvi dvoma rozetovými metódami a na niektoré hematologické ukazovatele.

MATERIÁL A METÓDY

ZVIERATÁ A USPORIADANIE POKUSOV

Pre pokusy sme použili 10 prasiat 21 deň starých, plemeno biele ušľachtilé, o hmotnosti 8 až 10 kg. Pred pokusom boli zvieratá orientačne helmintoovoskopicky vyšetrené metódou podľa Brezu (1959). Výsledok bol negatívny.

Na porovnanie sme overili percentuálne zastúpenie T a B lymfocytov v krvi experimentálnych prasiat pred invadovaním, ako aj v krvi 10 zdravých jatočných prasiat z bitúnku.

Všetky prasatá sme experimentálne nakazili inváznymi vajčkami *Ascaris suum* primárnou dávkou 50 000 vajčiek na zviera. V 28. dni po primárnom invadovaní sme ich reinvadovali takou istou dávkou.

Krv invadovaných zvierat sme získali intrakardiálnym odberom tesne pred invadovaním (nulý deň odberu), 3., 5., 7., 10., 13., 16. a 20. deň po primárnom invadovaní a 1., 3., 7. a 14. deň po sekundárnej dávke.

V tých istých dňoch sme sledovali počet leukocytov u každého zvieraťa pred invadovaním a po invadovaní v Bürkerovej komôrke a diferenciálny krvný obraz sfarbením náterov podľa May-Grünwalda-Giemsu pri počítaní 100 buniek.

PRÍPRAVA BUNEČNEJ SUSPENZIE (Procházková, 1979)

Suspenziu lymfoidných buniek sme získali z čerstvej intrakardiálne odobratej heparinizovanej krvi na diskontinuálnom gradiente roztoku 60% verografinu (Spofa).

Interfázu bohatú na mononukleárne bunky sme odsali mikropipetou napojenou hadičkou na striekačku. Bunečnú suspenziu sme tri razy premyli centrifugáciou v tlmivom fosfát-fyziologickom roztoku pri pH 7,2 po dobu 10 minút pri otáčkach 1000 g a reziduálne červené krvinky sme lyzovali krátkou inkubáciou (7 minút) v 0,83% chloride amónnom. Životaschopnosť lymfoidných buniek sme určovali pomocou 0,4% roztoku trypanovej modrej.

E-ROZETOVÝ TEST (Jarošková, 1979)

Čistú suspenziu izolovaných lymfoidných buniek v koncentrácii cca $10^6/0,1$ ml sme zmiešali s rovnakým objemom bovinného fetálneho séra (VŠV, Brno) a s dvojnásobným objemom 0,5% baraních erytrocytov.

Pomer baraních erytrocytov a lymfocytov bol 50 : 1.

EAC-ROZETOVÝ TEST (Komárek, 1979)

Pri stanovení B lymfocytov na základe ich receptorov pre komplement sme dodržiavali pôvodný postup menovaného autora s tým rozdielom, že baranie erytrocyty sme stabilizovali v Alseverovom roztoku päť dní. Pracovali sme s morčacím komplementom v titrovej hodnote 1 : 160 a 1 : 320 (namiesto myšacieho komplementu v titrovej hodnote 1 : 10).

E a EAC rozety sme vyhodnocovali mikroskopom MP 3 s obrazovkou (PLR).

VÝSLEDKY

Priemerné hodnoty percentuálneho zastúpenia T a B dependentných buniek v jednotlivých dňoch sledovaného obdobia a niektoré hematologické ukazovatele sme uviedli v tab. I. Ako z tabuľky vyplýva, boli tesne pred invadovaním prasiat, t. j. v nultom dni odberu, hodnoty percentuálneho zastúpenia populácie T buniek v periférnej krvi 29,6 % a B lymfoidných buniek 13,4 %. Prvé zvýšenie hodnôt buniek formujúcich E a EAC

I. Priemerné hodnoty buniek formujúcich E a EAC rozety a niektoré hematologické ukazovatele z periférnej krvi ošipáných experimentálne invadovaných dávkou 50 000 vajíčok *Ascaris suum* na prasa — The average values of cells forming the E and EAC rosettes, and some haematological data on the peripheral blood of pigs experimentally invaded with 50 000 eggs of *Ascaris suum* per piglet

Deň odberu krvi	E rozety %	EAC rozety %	Leukocyty mm ³	Lymfocyty %	Granulocyty %	Monoocyty %
0. deň	29,6	13,4	10 700	52,8	44,0	2,6
3. deň	32,7	17,0	16 260	55,5	31,5	3,0
7. deň	35,5	18,0	22 750	64,6	34,0	1,6
10. deň	41,1	20,2	21 430	71,2	24,2	4,5
13. deň	50,0	22,8	22 420	72,2	24,2	3,6
16. deň	38,2	11,9	19 520	68,6	28,6	3,8
20. deň	31,1	9,7	14 350	60,0	21,6	6,0
reinvázia						
1. deň	44,2	27,2	28 200	75,4	27,4	5,2
3. deň	40,8	26,8	25 180	72,6	24,8	4,6
7. deň	34,4	20,4	21 830	69,4	23,5	5,1
14. deň	29,6	17,2	18 810	55,8	32,3	6,2

rozety sme zaznamenali v treťom dni odberu, a to u obidvoch bunkových populácií (T dependentné bunky 32, 7 % a B dependentné bunky 17 %).

Vzostupnú fázu vo výskyte T a B dependentných lymfoidných buniek sme pozorovali aj v ďalšom dni odberu, t. j. siedmy deň po invázii, kedy T bunková populácia dosiahla hodnotu 35,5 % a B populácia buniek 18,0 %.

Tento nárast buniek formujúcich rozety, zastúpených obidvoma bunkovými populáciami (T a B), pretrvával aj do desiateho dňa po invázii, kedy percentuálne zastúpenie hodnôt T buniek bolo 41,1 % a B buniek 22,2 %.

Dynamika T a B dependentných bunkových populácií dosiahla svoj vrchol v 13. dni po invázii s hodnotami 50,0 % u buniek formujúcich E rozety a 22,8 % u buniek formujúcich EAC rozety.

V nasledujúcom dni odberu, t. j. 16. deň po invázii prasiat, sme zaznamenali zostupnú tendenciu obidvoch bunkových populácií, a to u T dependentných lymfocytov na 38,2 % a u B dependentných buniek na 11,9 %.

Najnižšia aktivita rozety formujúcich buniek sa prejavila v 20. dni po primárnej inváznej dávke, s hodnotami 31,1 % u populácie T buniek a 9,7 % u populácie B buniek.

Po reinvadovaní prasiat, 28. deň po primárnej dávke, došlo v ďalšom dni (1. deň po reinvázii) k prudkému nárastu hodnôt E a EAC rozety formujúcich buniek (T bunky 44,2 %, B bunky 27,2 %), ktoré sa u dependentných lymfocytov priblížili k hodnotám dosiahnutým v čase ich maximálneho výskytu, t. j. v 13. dni po primárnej dávke.

Relatívne vysoké hodnoty obidvoch bunkových populácií v krvi pretrvávali aj v ďalšom dni odberu, t. j. v treťom dni po reinvázii, a to u T bunkovej populácie 40,8 % a B bunkovej populácie 26,8 %.

V ďalšom dni odberu (siedmy deň po reinvázii) sme zaznamenali pokles hodnôt u T (34,4 %) ako aj u B dependentných lymfocytov (20,4 %).

V poslednom dni sledovaného obdobia, t. j. 14. deň po reinvázii, boli hodnoty T lymfocytov u prasiat rovnaké ako pred ich inváziou (29,6 %) a B lymfocyty dosiahli hodnotu 17,2 %.

Percentuálne zastúpenie obidvoch imunocelulárnych populácií u jačočných prasiat vykazovalo individuálnu variabilitu (u E roziet od 34,6 % do 44,9 %, u EAC roziet od 14,6 % do 24,7 %).

Sledovanie bielej zložky krvného obrazu poukázalo na priamu súbežnosť medzi stanoveným počtom leukocytov a množstvom E a EAC roziet. V priamej závislosti od zvýšenia počtu lymfocytov sa zvyšoval aj počet roziet. Tento proces bol dynamický a s poklesom hodnôt lymfocytov v 16. dni došlo aj k adekvátnemu poklesu T a B buniek, a tým aj k zníženiu počtu E a EAC roziet.

DISKUSIA

Predložená práca bola zameraná na kvantitatívne vyhodnotenie dvoch bunkových populácií (T a B lymfoidných buniek) v periférnej krvi odstaviť po experimentálnej invázii vajčkami *A. suum* dvoma rozetovými metódami (E a EAC). T dependentné lymfocyty sme identifikovali na základe ich membránových receptorov pre baranie erytrocyty a pre detekciu B lymfocytov sme použili väzbu baraních erytrocytov senzibilizovaných hemolytickou protilátkou a komplementom.

Aktivita obidvoch sledovaných recirkulujúcich bunkových populácií začala stúpať v periférnej krvi už v treťom dni po invázii, s maximom v 13. dni a s fázou poklesu ku 20. dňu po primárnej inváznej dávke. Podľa našich výsledkov je tento proces v korelácii so zvláštnosťami vývinového cyklu *A. suum*, keďže je známe, že larválne štádiá tohto helminta končia v 12. až 14. dni migračnú fázu a v dôsledku ich prechodu do črevného lumenu strácajú na intenzite antigénne signály, predtým podmienené úzkym kontaktom lariev s tkanivom. Intenzívna imunocelulárna odpoveď po reinvázii je dôkazom imunologickej pamäti, zakotvenej vo väčšine prípadov v T dependentných bunkách (Poleta je v o v a, 1978).

Podľa súčasných poznatkov (Jeršov, 1966; Khoury a Soulsby, 1977a, b; Nováková, 1971) má pri migračnej fáze experimentálnej askaridózy aktívna imunocelulárna odpoveď u hostiteľa lokálny charakter. Obidve bunkové populácie prevládajú v čase migrácie v korešpondujúcich lymfatických uzlinách a v slezine, čo súvisí s hlavnými črtami distribúcie antigénu v lymfoidnom systéme po perorálnom invadovaní. V uvedenom období dochádza totiž k záplave hostiteľského organizmu somaticko-metabolickými antigénmi migrujúcich larválnych štádií škrkaviek.

Objaveniu sa sledovaných imunocelulárnych elementov v krvi predchádza teda ich aktivácia v regionálnych lymfoidných orgánoch. Khoury a Soulsby (1977) detekovali prvé zvýšenie hodnôt T a B

lymfocytov už prvý a druhý deň po invázii morčiat v hepatálnych mezenterických lymfatických uzlinách a v slezine, kde dochádza k ich proliferácii, blasttransformácii a deleniu. Stotožňujeme sa s názorom Poletajevovej [1978], že v priebehu migračnej fázy askaridózy je tvorba cirkulujúcich protilátok podmienená mobilizáciou B dependentného bunkového systému.

Neustála konfrontácia imunokompetentných buniek s antigénnym materiálom migrujúcich štádií askaríd je zabezpečená ich schopnosťou masívnej recirkulácie medzi lymfoidnými orgánmi a krvou (Gowans a Knight, 1964). Vzhľadom na to predstavuje aktivita T a B dependentného bunkového systému objektívne kritérium pri posudzovaní špecifických helmintohostiteľských interakcií, ktoré začínajú už v ranej fáze invázie.

Biela zložka krvného obrazu bola v priamej korelácii so zmenami počtu T a B buniek, čo poukazuje na význam hemopoetického systému pri adaptácii organizmu na antigénne stimuly.

Aj keď vzájomné interakcie T a B buniek pri askaridóze sú zatiaľ ešte stále nejasné, získané výsledky — po overení distribúcie obidvoch bunkových populácií v lymfoidných orgánoch prasiat uvedenými metódami — sa uplatnia pri hlbšom poznaní mechanizmov imunity pri danej helmintóze.

Literatúra

- BREZA, M.: Zlepšenie metodiky koproovoskopického vyšetrovania trusu ošípaných s použitím nového flotačného roztoku a Mukogélu (Mucogel liq.). Vet. Čas., 8, 1959, s. 569-578.
- GOWANS, J. L. — KNIGHT, E. J.: The route of recirculation of lymphocytes in the rat. Proc. R. Soc., B., 159, 1964, s. 257-263.
- JAROŠKOVÁ, J.: EAC rozetový test. Imunol. Zprav., 2, 1979, s. 29-31.
- JERŠOV, V. S.: Mechanizm immuniteta pri gel'mintozach sel'skochozjajstvennyh životnyh. Mat. nauč. konf. VOG, Moskva, časť 2, s. 76-104.
- KHOURY, P. B. — SOULSBY, E. J. L.: *Ascaris suum*: Immune response in the guinea pig. I. Lymphoid cell response during primary infections. Expl Parasit., 41, 1977a, s. 141-159.
- KHOURY, P. B. — SOULSBY, E. J. L.: *Ascaris suum*: I. Lymphoid cell response during secondary infections in the guinea pigs. Expl Parasit., 41, 1977b, s. 432-445.
- KOMÁREK, J.: EAC rozetový test. Imunol. Zprav., 2, 1979, s. 29-31.
- NAKASATO, H.: Immunoglobulin levels in helminthic infections: Ancylostomiasis, ascariasis and trichuriasis. Jap. J. Parasit., 23, 1974, s. 325-334.
- NOVÁKOVÁ, I.: Primárne imunohostiteľské interakcie špecifického a nešpecifického hostiteľa pri askaridóze. [Kandidátska dizertačná práca.] Košice, 1971 — Helminologický ústav SAV.
- POLUJEKTOVA, A. F.: Reakcija svjazyvaniya komplemента pri askaridoze svinej. Bjull. VIGIS, 8, 1972, s. 48-52.
- POLETAJEVA, O. G.: Zaščitnoje dejstvije gumoraľnyh antitel pri larvaľnom askaridoze. Mad. Parasitol., Moskva, 46, 1978, s. 171-176.
- PROCHÁZKOVÁ, J.: Separace lymfocytů verografinem. Imunol. Zprav., 2, 1979, s. 17-19.

Došlo dňa 22. 4. 1982

БОРОШКОВА, З. — БЕНКОВА, М. — АЛЕКСАНДЕР, Р. (Институт биологии САН, Кошице): Изменение числа Т и В лимфоцитов в крови поросят после экспериментального аскаридоза. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12): 741-746.

Изменение числа Т и В возникающих клеток в периферической крови после эксперимен-

тального заражения поросят (живым весом 8—10 кг) яйцами *Ascaris suum* (50 000 яиц на поросенка). При детектировании обеих популяций клеток двумя розеточными методами (Е и ЕАС) оказалось, что их первый подъем наступает на третий день после инвазии. Максимум появления Т и В клеток был отмечен на 17-ый день после инвазии, на 20-ый день их число понизилось до исходного уровня. Одновременно у экспериментальных поросят наблюдали за белой картиной крови. Между результатами гематологических обследований наблюдалась прямая зависимость с результатами розеточных методов. Из наблюдений очевидно, что у специфического хозяина чувствительность Т и В лимфоидных клеток к антигенному сигналу начинается еще в ранней фазе инвазии.

свиньи; *Ascaris suum*; экспериментальная инвазия; розеточные испытания; Т и В лимфоидные клеточные популяции

BOROŠKOVÁ, Z. — BENKOVÁ, M. — ALEXANDER, R. (Helminthological Institute, Slovak Academy of Sciences, Košice): *Changes in the Number of the T and B Lymphocytes in the Blood of Piglets after Experimental Ascariasis*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 741-746.

The changes in the number of the T and B dependent cells in the peripheral blood were studied after experimental invasion of piglets (live weight 8—10 kg) with the eggs of *Ascaris suum* (50 000 eggs per piglet). The detection of both cell populations by two rosette methods (E and EAC) showed that their first rise set in on the third day from invasion. The maximum occurrence of the T and B cells was recorded 17 days from invasion; on the 20th day from invasion their number returned to the initial level. At the same time, the test animals were studied as to the white component of their blood picture. The results of the haematological study were found to show a direct relationship with the results of the rosette methods. It follows from the study that in the specific host the susceptibility of the T and B lymphoid cells to the antigenic signal starts already in the early stage of invasion.

pig; *Ascaris suum*; experimental invasion; rosette tests; T and B lymphoid cell populations

BOROŠKOVÁ, Z. — BENKOVÁ, M. — ALEXANDER, R. (Helminthological Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Košice): *Veränderte Zahl von T- und B-Lymphozyten im Blut von Schweinen nach experimenteller Ascariidose*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 741-746.

Wir untersuchten die sich ändernden Zahlen von der T- und B-dependenden Zellen im peripheren Blut nach einer experimentellen Invasion bei Schweinen (Lebendmasse 8—10 kg) durch *Ascaris-suum*-Eier (50 000 A. suum-Eier je Schwein). Bei der Detektion beider Zellenpopulationen mit Hilfe zweier Rosettenmethoden (E und EAC) erwies es sich, daß ihr erster Aufschwung am dritten Tag nach der Invasion erfolgt. Das Maximum des Vorkommens der T- und B-Zellen wurde am 17. Tag nach der Invasion verzeichnet, am 20. Tag ging ihre Anzahl auf den Anfangswert zurück. Gleichzeitig untersuchten wir bei den Versuchstieren die weiße Komponente des Blutbilds. Zwischen den Ergebnissen der hämatologischen Untersuchungen und den Ergebnissen der Rosettenmethoden wurde eine direkte Relation beobachtet. Aus den Beobachtungen geht hervor, daß beim spezifischen Wirt die Sensibilität der T- und B-Lymphoidzellen auf das antigene Signal bereits in der zeitigen Phase der Invasion beginnt.

Schweine; *Ascaris suum*; experimentelle Invasion; Rosetten-Teste; T- und B-Lymphoidzellenpopulationen

Adresa autorov:

MVDr. Zora Borošková, CSc., MVDr. Magda Benková, CSc., MVDr. Robert Alexander, CSc., Helminologický ústav SAV, ul. Dukelských hrdinov 11, 040 00 Košice

VYŠETŘOVÁNÍ SÝRŮ NA PŘÍTOMNOST STERIGMATOCYSTINU

J. Bartoš, Z. Matyáš

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Vyšetřování sýrů na přítomnost sterigmatocystinu*. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12) : 747-752.

Chromatografickou metodou s využitím tenké vrstvy silikagelu jsme vyšetřili 66 vzorků tvrdých sýrů (Eidamský blok, Eidamská cihla, Světlán, Moravský blok, Ementál), odebraných z prodejen maloobchodní sítě. Tři vzorky byly pozitivní. Semikvantitativním vyšetřením jsme zjistili, že dva vzorky Eidamské cihly obsahovaly 7,5 a 17,5 μg sterigmatocystinu v kilogramu a jeden vzorek Moravského bloku obsahoval 7,5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Popsaná metoda se pro svoji jednoduchost doporučuje pro praktické vyšetřování sýrů na přítomnost sterigmatocystinu ve vyšetřovacích ústavech.

potravin y živočišného původu; mléčné výrobky; mykotoxiny; TLC; sterigmatocystin; sýry

Sterigmatocystin je produkován plísněmi *Aspergillus versicolor*, *A. rugulosum*, *A. nidulans*, *Bipolaris species* a *Penicillium luteum*. Hlavní producent *A. versicolor* je ubikvitární, roste na kukuřici, krmivech, chlebu, vysušeném ovoci, sýrech, rýži, sójové moučce a masných produktech. Sterigmatocystin patří mezi rizikové látky, neboť působí kancerogenně, hepatotoxicky, dermatotoxicky a vyvolává nekrózu ledvin. Kancerogenní účinek popsali Dickens a Jones (1965), Dickens aj. (1966), Purchase a van der Watt (1968, 1970), Fujii aj. (1976) a Chu (1977). Sterigmatocystin byl zjištěn jako přirozený kontaminant kukuřičné mouky z jižní Afriky (Holzapfel aj., 1966), zelené kávy z jižní Afriky (Purchase a Pretorius, 1973), pšenice z Kanady (Scott, aj., 1972; Wallace a Sinha, 1962) a ječmene z Anglie (Shreeve aj., 1975). Northolt aj. (1980) zjistili v Holandsku při zrání sýrů převážně výskyt plísní: *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, *Aspergillus versicolor*, *A. repens* a *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum*. Sýry zaplísňené plísní *A. versicolor* vyšetřili na přítomnost sterigmatocystinu. Z 39 vzorků jich devět obsahovalo v povrchové vrstvě 5 až 600 μg sterigmatocystinu v kilogramu sýru.

Účelem této práce bylo vypracovat a doporučit vhodnou jednoduchou metodu na zjišťování sterigmatocystinu v sýrech, která by byla využitelná v našich podmínkách.

MATERIÁL A METODA

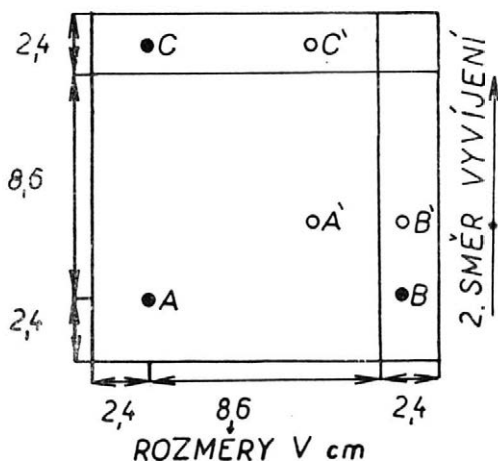
Po prostudování literatury týkající se sterigmatocystinu jsme se zaměřili na analytické metody, které popsali Siriwardana a Lafont (1979), Kiermeier a Kraus (1980), van Egmond aj. (1980) a Engel a Teuber (1980). Jako nejvhodnější vzhledem k našim podmínkám jsme zvolili metodu popsanou van Egmondem aj. (1980). Dále uvádíme podrobný analytický postup námi použité metody, neboť pracovní postup jsme byli nuceni upravit vzhledem k nedostupnosti některých chemikálií.

Extrakce: K 20 g nastrohaného tvrdého sýru (horní vrstva do hloubky 0,5 až 1 cm) se přidá 180 ml metanolu a 20 ml 4% roztoku chloridu draselného a homogenizuje se dvě minuty. Pak se filtruje přes skládaný filtrační papír. 100 ml filtrátu se přeleje do odpařovací baňky a pomocí vakuového rotačního odpařovače se zahustí asi na 20 ml. Při dalším zahuštění by se už mohly tvořit krystalky sterigmatocystinu na stěnách skla. Teplota vodní lázně se udržuje na 38 až 40 °C, aby se předešlo pění.

Čištění na sloupci: Používá se chromatografická skleněná trubice o rozměrech 22 X 300 mm. Florisil se aktivuje 48 hodin při teplotě 130 °C v sušárně, pak se deaktivuje na 10% vody. Použije se až druhý den a spotřebovává se nejdéle deset dní. Do trubice se nalezí 75 ml směsi etanol:voda (9:1), přidá se 10 g Florisilu o zrnění 100–200 mesh, promíchá se, až se utvoří kaše. Florisil se nechá sedimentovat, pak se nalezí směs etanol:voda (9:1) asi 5 cm nad horní vrstvu Florisilu. Na Florisil se dá bavlněná zátk a doleje se směs etanol:voda (9:1) až po vrchní okraj zátky. Pak se nanese extrakt na sloupec. Rychlost průtoku se upraví na 5 až 7 ml/min. Nádobka s extraktem se propláchne 2 X 10 ml hexanu a přidá se na sloupec ještě s dalšími 80 ml hexanu a eluuje se rychlostí 5 až 7 ml/min. Hexan se odleje. Toxin se eluuje 200 ml směsí aceton:chloroform (5:95). Eluát se vysouší přidáním 25 g bezvodého síranu sodného po dobu 30 minut, pak se filtruje a odpaří do sucha. Odparek se kvantitativně přenesení do lékovky pomocí chloroformu. Chloroform se odpaří pod dusíkem na plotně při teplotě 50 °C.

Chromatografie na tenké vrstvě silikagelu: Použijí se fólie Silufolu R nebo Silufolu UV 254 o rozměrech 13,4 X 13,4 cm. Odparek se rozpustí ve 200 µl chloroformu. Na bod A (obr. 1) se nanáší vzorek v množství 20 µl nebo 40 µl. Na bod B a C se nanáší 10 µl standardu sterigmatocystinu (5 µg v 1 ml chloroformu) = 50 ng sterigmatocystinu. Chromatogram se vyvíjí v prvním směru v nenasyčené komoře v soustavě chloroform:metanol (100:2). Po vyjmutí se chro-

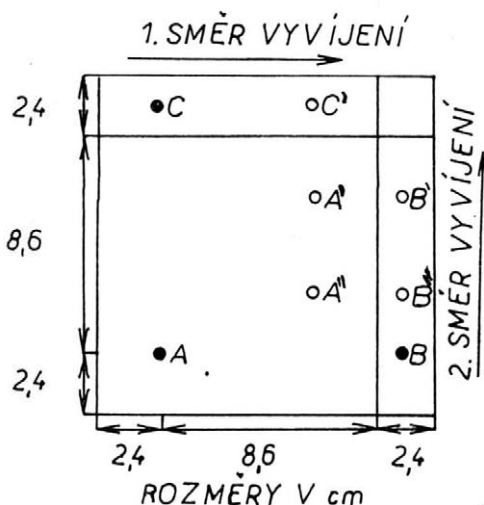
1. SMĚR VYVÍJENÍ



- A = nanášení vzorku
- B, C = nanášení standardu
- A' = poloha sterigmatocystinu ze vzorku po vyvíjení
- B', C' = poloha sterigmatocystinu standardu po vyvíjení

1. Schéma nanášení a stav po vyvíjení fólií — Diagram of spotting and the situation after the development of films

- A = nanášení vzorku
 B, C = nanášení standardu
 A' = slabá žlutá fluorescence nezreagovaného sterigmatocystinu vzorku
 B', C' = slabá žlutá fluorescence nezreagovaného sterigmatocystinu standardu
 A'' = silná žlutá fluorescence reakčního produktu sterigmatocystinu s trifluoroctovou kyselinou (vzorek)
 B'' = silná žlutá fluorescence reakčního produktu sterigmatocystinu s trifluoroctovou kyselinou (standard)



2. Schéma nanášení a stav po potvrzovacím testu — Diagram of spotting and the situation after verification test

matogram suší pět minut při pokojové teplotě. Pak se vyvíjí v druhém směru v nenasycené komoře v soustavě hexan : etyléter : kyselina octová (75 : 25 : 10). Po vyjmutí se chromatogram suší 15 minut při pokojové teplotě. Pak se fólie postříká roztokem chloridu hlinitého (20 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml etanolu) a zahřívá se v sušárně při teplotě 100 °C deset minut. Ihned se prohlíží pod UV lampou (v našem případě přístroj Fluotest Universal fy Original Hanau Quarzlampen, NSR). Pozorujeme jasně žlutou fluorescence sterigmatocystinu. Výhodné je dělat současně další test, při kterém na další fólii na bod A nanášíme 50 ng standardu sterigmatocystinu a 40 μl vzorku.

Je-li k dispozici kyselina trifluoroctová, je možné udělat potvrzovací test tímto postupem: Na fólii o rozměrech 13,4 X 13,4 cm se nanese vzorek na bod A a standard na bod B a C a vyvine se v prvním směru, jak bylo uvedeno (obr. 2). Fólie se suší pět minut při pokojové teplotě a postříká se stejnoměrně roztokem 5 ml trifluoroctové kyseliny s 20 ml benzenu. Nechá se deset minut reagovat v temnu, deset minut se suší proudem vzduchu při teplotě 40 až 50 °C. Chromatogram se vyvíjí v druhém směru směsí chloroform : metanol (100 : 2). Nechá se pět až deset minut oschnout při pokojové teplotě a postříká se roztokem chloridu hlinitého. Zahřívá se deset minut při teplotě 100 °C. Prohlíží se pod dlouhovlnným UV světlem při 365 nm. Přítomnost sterigmatocystinu v extraktu je potvrzena, když se shodují hodnoty R_f derivátu sterigmatocystinu standardu i vzorku. Standard sterigmatocystinu (5 mg) jsme získali od firmy Société d'Industries Opthériques, 2, Rue Felicien-David 78100 Saint-Germain-En Laye, Francie.

Na přítomnost sterigmatocystinu jsme vyšetřili 66 vzorků tvrdých sýrů (Eidamský blok, cihla — 39 vzorků, Světlan — 5 vzorků, Moravský blok — 7 vzorků, Ementál — 15 vzorků), nakupovaných v maloobchodní síti brněnských prodejen v letech 1981 a 1982.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve čtyřech pokusech jsme přidávali ke kůře tvrdého sýru Eidamská cihla standard sterigmatocystinu v množství 20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (1X), 10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (2X) a 5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (1X). Konečný odparek jsme rozpouštěli ve 200 μl chloroformu a na fólii jsme nanášeli 20 a 40 μl . Pozitivní nálezy byly zjištěny ve všech případech při analýze 20 i 10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Při

koncentraci 5 μg sterigmatocystinu v kilogramu sýru byl výsledek při nanesení 20 μl vzorku dubiózní a zřetelně pozitivní byly až při nanesení dvojnásobného množství (40 μl). Těmito pokusy jsme zjistili, že námi použitý analytický postup dovoluje určit ještě koncentraci 5 μg sterigmatocystinu v kilogramu sýru a že nečistoty nepůsobily rušivě, i když jsme byli nuceni použít pro eluci místo dichlormetanu chloroform a vypustit celé čištění polyamidovým práškem. Z 66 vzorků tvrdých sýrů byly tři vzorky pozitivní. Při semikvantitativním vyšetření obsahovaly dva vzorky Eidamské cihly 7,5 a 17,5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ a jeden vzorek Moravského bloku 7,5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Z mykotoxinů, které se mohou přirozeně vyskytovat v sýrech, je po aflatoxinech nejzávažnější sterigmatocystin. Z dalších mykotoxinů se může v sýrech vyskytnout mykofenolová kyselina, PR-toxin, roquefortin, cyclopiazonová kyselina, kyselina penicillová, patulin a penitrem A. Plísň se dostanou na sýry velmi snadno při zrání v sýrárnách, dále pak ve skladištích, obchodech a v domácnostech. Některé plísň mohou produkovat toxické metabolity, které do sýrů pronikají. Proto ani čištění povrchu sýrů není postačující, poněvadž v případě, kdy plíseň nemá nežádoucí vliv na organoleptickou jakost sýrů, není dostatečné. V dostupné literatuře jsme dosud nezjistili práce, které by pojednávaly o přípustných koncentracích sterigmatocystinu v sýrech. Z hlediska hygienického by měly být zavedeny v praxi metody zjišťování kancerogenních mykotoxinů přirozeně se vyskytujících v sýrech. Popsanou metodu doporučujeme pro vyšetřování tvrdých sýrů na možnou přítomnost sterigmatocystinu.

Poděkování: Za technickou spolupráci děkujeme s. B. Seidlové.

Literatura

- DICKENS, F. — JONES, H. E. H.: Further studies on the carcinogenic action of certain lactones and related substances in the rat and mouse. Br. J. Cancer, 19, 1965, s. 392-403.
- DICKENS, F. — JONES, H. E. H. — WAYNEFORTH, H. B.: Oral, subcutaneous and intratracheal administration of carcinogenic lactones and related substances; the intratracheal administration of cigarette tar in the rat. Br. J. Cancer, 20, 1966, s. 134-144.
- EGMOND van, H. P. — PAULSCH, W. E. — DEIJLL, E. — SCHULLER, P. L.: Thin layer chromatographic method for analysis and chemical confirmation of sterigmatocystin in cheese. J. Ass. off. analyt. Chem., 63, 1980, s. 110-114.
- ENGEL, G. — TEUBER, M.: Bildung und Verteilung von Sterigmatocystin in Käse nach Beimpfung mit *Aspergillus versicolor* und *Aspergillus nidulans*. Milchwissenschaft, 35, 1980, s. 721-723.
- FUJII, K. — KURATA, H. — ODASHIMA, S. — HATSUDA, Y.: Tumor induction by a single subcutaneous injection of sterigmatocystin in newborn mice. Cancer Res., 36, 1976, s. 1615-1618.
- HOLZAPFEL, C. W. — PURCHASE, I. F. H. — STEYN, P. S. — GOUWS, L.: The toxicity and chemical assay of sterigmatocystin, a carcinogen mycotoxin, and its isolation from two new fungal sources. S. Afr. med. J., 40, 1966, s. 1100-1101.
- CHU, F. S.: Mode of action of mycotoxins and related compounds. Adv. appl. Microbiol., 22, 1977, s. 83-143.
- KIERMEIER, F. — KRAUS, P. V.: Zum wahrscheinlichen Vorkommen von Sterig-

matozystin in Milch und dessen Verhalten in Käse. Z. Lebensmittelunters. Forsch., 170, 1980, s. 421-424.

NORTHOLT, M. D. — EGMOND van, H. P. — SOENTORO, P. — DEIJLL, E.: Fungal growth and the presence of sterigmatocystin in hard cheese. J. Ass. off. analyt. Chem., 63, 1980, s. 115-119.

PURCHASE, I. F. H. — WATT van der, J. J.: Carcinogenicity of sterigmatocystin. Fd Cosmet. Toxicol., 6, 1968, s. 555-556.

PURCHASE, I. F. H. — WATT van der, J. J.: Carcinogenicity of sterigmatocystin. Fd Cosmet. Toxicol., 8, 1970, s. 289-295.

PURCHASE, I. F. H. — PRETORIUS, M.: Sterigmatocystin in coffee beans. J. Ass. off. analyt. Chem., 56, 1973, s. 225-226.

SCOTT, P. M. — WALBEEK van, W. — KENNEDY, B. — ANYETI, D.: Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. J. agric. Fd Chem., 20, 1972, s. 1103-1109.

SHREEVE, B. J. — PATTERSON, D. S. P. — ROBERTS, B. A.: Investigation of suspected cases of mycotoxicosis in farm animals in Britain. Vet. Rec., 97, 1975, s. 275-278.

SIRIWARDANA, M. C. — LAFONT, P.: Determination of mycophenolic acid, penicillic acid, patulin, sterigmatocystin, and aflatoxins in cheese. J. Dairy Sci., 62, 1979, s. 1145-1148.

WALLACE, H. A. H. — SINHA, R. N.: Fungi associated with hot spots in farm stored grain. Can. J. Plant Sci., 42, 1962, s. 130-141.

Došlo dne 7. 6. 1982

БАРТОШ, Я. — МАТЫЯШ, З. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Обследование сыров на содержание стеригматоцистина. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12): 747-752.

Методом хроматографии на тонком слое силикагеля обследовали 66 образцов твердых сычужных сыров (эйдямский блок, эйдямский брусок, светлан, моравский блок, эмментальский сыр), взятых из магазинов розничной торговой сети. Три образца оказались положительными. Путем полуквантитативного анализа установили, что два образца эйдямского бруска содержали 7,5 и 17,5 мг стеригматоцистина в килограмме сыра и один образец моравского бруска содержал 7,5 мг на кг. Описанный метод ради своей простоты рекомендуется для практического обследования сыров в контрольно-испытательных институтах на наличие стеригматоцистина.

продукты животного происхождения; молочные изделия; микотоксины; хроматография на тонком слое силикагеля (TLC); стеригматоцистин; сыры

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Veterinary Research Institute, Brno): Examination of Cheeses for Sterigmatocystine. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12): 747-752.

Sixty-six samples of hard cheeses (Edam Block, Edam Cake, Světlan, Moravian Block, Emmenthal), taken from retail shops, were examined by the chromatographic method using thin silica-gel layer. Three samples were positive. It was demonstrated by semiquantitative examination that two samples of Edam Cake contained 7.5 and 17.5 µg of sterigmatocystine in kg and one sample of Moravian Block contained 7.5 µg/kg. The described method is very simple and is recommended to be used by food-control institutions for the practical examination of cheese for the presence of sterigmatocystine.

food of animal origin; dairy products; mycotoxins; TLC; sterigmatocystine; cheese

BARTOŠ, J. — MATYÁŠ, Z. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): Untersuchung von Käsen auf die Anwesenheit von Sterigmatozystin. Vet. Med., Praha, 27, 1982 (12): 747-752.

Mit Hilfe der chromatographischen Methode mit Silikagel-Dünnschicht untersuchten wir 66 aus dem Kleinhandel stammende Proben von Hartkäsen (Edamer Blockkäse,

Edamer Ziegel, Světlan, Mährischer Blockkäse, Emmentaler). Drei Proben erwiesen sich als positiv. Durch semiquantitative Untersuchung wurde festgestellt, daß zwei Proben der Edamer Ziegel 7,5 und 17,5 μg Sterigmatozystin im Kilogramm enthielten und eine Probe des Mährischen Blockkäses enthielt 7,5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Die beschriebene Methode wird für ihre Einfachheit für praktische Untersuchungen von Käsen auf die Anwesenheit von Sterigmatozystin in Untersuchungsanstalten empfohlen.

Nahrungsmittel tierischer Herkunft; Milchprodukte; Mykotoxine; TLC (Dünnschichtchromatographie auf Silikagel); Sterigmatozystin; Käse

Adresa autorů:

MVDr. Jaroslav Bartoš, CSc., prof. MVDr. Zdeněk Matyáš, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

Elečko J., Bekeová E., Choma J., Maraček I.: Koncentrácia progesterónu a tyroxínu v luteálnej fáze cyklu jalovic po ovplyvnení estradiol benzoátom	705
Kozumplík J., Vinkler A.: Hladina testosteronu a 17- β -estradiolu v semenné plazme býkú a kancú	715
Jalč D., Zelenák I., Baran M.: Stanovenie stráviteľnosti lignocelulózových materiálov vrecúškovou (nylon bag) metódou	721
Pavlásek I.: Výskyt <i>Cryptosporidium</i> sp. u nucené odporažených telat a prúbeh vylučování oocyst tohoto prvoka u telat na dvou farmách Jihočeského kraje	729
Borošková Z., Benková M., Alexander R.: Zmeny počtu T a B lymfocytov v krvi prasiat po experimentálnej askaridóze	741
Bartoš J., Matyáš Z.: Vyšetřování sýrů na přítomnost sterigmatocystinu	747

СОДЕРЖАНИЕ

Элечко Я., Бекеова Э., Хома Я., Марачек И.: Концентрация прогестерона и тироксина в лютеальной фазе цикла нетелей после обработки эстрадиол-бензоатом	705
Козумплик Я., Винклер А.: Уровень тестостерона и 17-бета-эстрадиола в семенной плазме быков и хряков	715
Ялч Д., Зеленьак И., Баран М.: Определение переваримости лигноцеллюлозных материалов по методу найлон бэг	721
Павласек И.: <i>Cryptosporidium</i> sp. у вынужденно забитых телят и выделение его ооцис в двух телятниках Южночешской области	729
Борошкова З., Бенкова М., Александер Р.: Изменение числа Т и В лимфоцитов в крови поросят после экспериментального аскаридоза	741
Бартош Я., Матяш З.: Обследование сыров на содержание стеригматоцистина	747

CONTENTS

Elečko J., Bekeová E., Choma J., Maraček I.: Progesterone and Thyroxine Concentration in the Luteal Stage of Heifer Cycle as Influenced by Estradiol Benzoate	705
Kozumplík J., Vinkler A.: The Levels of Testosterone and 17-beta-estradiol in the Seminal Plasma of Bulls and Boars	715
Jalč D., Zelenák I., Baran M.: Determination of the Digestibility of Lignocellulose Materials by the Nylon Bag Method	721
Pavlásek I.: The Occurrence of <i>Cryptosporidium</i> sp. in Emergency-Slaughtered Calves and the Course of Excretion of the Protozoan Oocysts in Calves on Two Farms in the South Bohemian Region	729
Borošková Z., Benková M., Alexander R.: Changes in the Number of the T and B Lymphocytes in the Blood of Piglets after Experimental Ascariasis	741
Bartoš J., Matyáš Z.: Examination of Cheeses for Sterigmatocystine	747

Elečko J., Bekeová E., Choma J., Maraček I.: Konzentration von Progesteron und Tyroxin in der Lutealphase des Zyklus von Färsen nach der Beeinflussung durch Estradiol Benzoat	705
Kozumplík J., Vinkler A.: Spiegel von Testosteron und 17-Beta-Estradiol im Samenplasma von Bullen und Ebern	715
Jalč D., Zelenák I., Baran M.: Bestimmung der Verdaulichkeit von Lignozellulosematerialien durch die Methode nylon bag	721
Pavlásek I.: Vorkommen von <i>Cryptosporidium</i> sp. bei gezwungen geschlachteten Kälbern und Verlauf der Ausscheidung von Oozysten dieses Einzellers bei Kälbern auf zwei Farmen des Südböhmischen Bezirkes	729
Borošková Z., Benková M., Alexander R.: Veränderte Zahl von T- und B-Lymphozyten im Blut von Schweinen nach experimenteller Ascaridose	741
Bartoš J., Matyáš Z.: Untersuchung von Käsen auf die Anwesenheit von Sterigmatozystin	747

Rukopisy odevzdány k tisku 3. 9. 1982 – Podepsáno k tisku 5. 11.



Rozšiřuje Poštovní novinová služba. Objednávky a předplatné přijímá PNS - ústřední expedice tisku, administrace odborného tisku, Jindřišská ulice 14, 110 00 Praha 1. Lze též objednat u každé pošty i poštovního doručovatele. Objednávky do zahraničí vyřizuje PNS - ústřední expedice tisku, oddělení vývozu tisku, Jindřišská ulice 14, 110 00 Praha 1. Vytiskl MÍR, novinářské závody, n. p., závod 6, tř. Lidových milicí 22, 120 00 Praha 2.