

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

2

ROČNÍK 28 (LVI)
PRAHA
ÚNOR 1983
CENA 10 Kčs
CS ISSN 0590-5214



ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

Vědecký časopis

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 Václavičková

© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1983

■

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozborů 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 и решенных задачах по научному исследованию в области ветеринарии. Издает 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.

TERAPEUTICKÉ POUŽITÍ SYNTETICKÉHO Gn-RH-DIRIGESTRANU PŘI PORUCHÁCH REPRODUKČNÍHO CYKLU KRAV V CHOVECH S NÍZKOU PLODNOSTÍ

O. Rob, V. Klimeš, F. Reichel, L. Kohout, K. Čep

ROB, O. — KLIMEŠ, V. — REICHEL, F. — KOHOUT, L. — ČEP, K. (Vysoká škola zemědělská, Praha; Výzkumný ústav pro biofaktory a veterinární léčiva, Pohoří-Chotouň; Okresní veterinární zařízení, Praha-východ): *Terapeutické použití syntetického Gn-RH-Dirigestrinu při poruchách reprodukčního cyklu krav v chovech s nízkou plodností*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 65-72.

Syntetického Gn-RH-Dirigestrinu Spofa bylo použito k ošetření 121 krav s funkčními poruchami ovarií. Z tohoto počtu se u 41 krávy ani postpartálně ani postservisně neprojevovaly příznaky říje, 59 krav bylo tzv. přebíhalek s nepravidelnými cykly a u 21 krávy byl zjišťován nepravidelný průběh říje. Ošetření bylo uskutečněno v chovech s nízkou úrovní zabřezávání (32—37 % zabřeznutí po první inseminaci, service perioda 108—142 dny). Celkově zabřezlo 80,1 % z ošetřených plemenic, 53,7 % jich zabřezlo po první inseminaci. Průměrná doba od aplikace po inseminaci, po které plemence zabřezly, byla 39 dnů. Léčba byla zahájena v průměru za 148 dnů po porodu. Průměrný inseminační index léčených a ošetřených krav byl 1,44. Z neříjících se krav zabřezlo 70,7 % celkem — 51,2 % po první inseminaci při terapeutické service periodě (TSP) 44 dny. Z krav přebíhalek s nepravidelným cyklem zabřezlo celkem 84,7 %, po první inseminaci 52,5 % při TSP 37 dnů a z krav s nepravidelným průběhem říje zabřezlo celkem 85,7 %, po první inseminaci 61,9 % při průměrné TSP 35 dnů. Dobře rozeznatelné symptomy říje po aplikaci Dirigestrinu se projeví celkem u 82 % ošetřených plemenic. Březost celého souboru (121 ošetřených krav) byla po první inseminaci o 15 až 21 %, po všech inseminacích o 41 až 49 % vyšší než březost normálně inseminovaných krav v těchto chovech. Dosažené výsledky potvrzují, že léčba funkčních poruch ovarií je vhodná i u plemenic skotu v chovech se sníženou plodností, pokud v nich nedochází k spermiotoxicitě nebo embryotoxicitě v důsledku neadekvátnosti sekretů pohlavního ústrojí, způsobené nesprávnou výživou nebo infekcemi pohlavního ústrojí.

funkční poruchy; terapie; skot

Jedním ze závažných problémů v chovu skotu jsou poruchy ovulace krav, subestrické stavy a anestrus u dojnic, zejména v poporodním údobí. Brewster a Cole (1941), Hansel (1959) a Zerobin (1969) prokázali, že za normálních okolností dochází k ovulaci za 10 až 14 hodin po odeznění zevních příznaků říje a Madan a Razdan (1967) stanovili, že průměrná doba od začátku říje do ovulace činí u zdravých dojnic 24 až 30 hodin. Karg (1970) prokázal, že 15 až 20 hodin před tím, než praskne folikul, dochází k výraznému vzestupu FSH a LH v krevním séru a že tento vzestup probíhá synchronně s maximální hladinou estrogenů. Tillmann (1969) uvádí, že poruchy ovulace a anafrodizie souvisí s poruchami endokrinních funkcí ovaria nebo

s malou aktivizací ovaria nedostatečným působením gonadotropinů, zejména FSH a LH. Tyto stavy se objevují nejčastěji v prvních 60 dnech po porodu a souvisí s neadekvátní výživou, trvalým ustájením, vysokou mléčnou užitkovostí a jinými zevními vlivy. Arbeiter (1975) prokázal, že při neporušeném puerperiu by se měla uskutečnit první inseminace kolem 50. dne po porodu. Pozoroval, že již kolem 15. dne po porodu se na ovariu vytváří folikul, který dále roste kolem 17. dne po první aktivaci. Tato folikulární fáze však probíhá většinou bez ovulace, ke které dojde až při třetím růstu folikulu.

Při těchto stavech lze říji indukovat buď biologicky, denní aktivací plemenic býkem průběhem již od 12. dne po porodu (Šipilov, 1981), nebo hormonálně (Schaetz, 1977). Jestliže se ovulace opozdí o více než 24 hodiny, je reinseminace již zbytečná, protože po této době se už zygota nevyvíjí normálně (Schaetz, 1977). Podle Lotthammera a Aehnelta (1977) je při přebíhání plemenic bez příznaků nutné brát do úvahy i možnost, že byla přehlédnuta říje, nebo že jde o nepoznanou poruchu ovulace, embryonální mortalitu, nerozeznatelný zánět pohlavního ústrojí či nesprávnou inseminaci. Holtemoller (1978) použil syntetického analogu Gn-RH Hoe 766 u 36 krav, u nichž se do šesti týdnů po porodu neprojevila říje a u nichž na vaječnicích nebylo palpovatelné žluté tělísko. Po aplikaci tohoto přípravku bylo 20 % krav inseminováno již mezi pátým až devátým dnem, 71,4 % mezi 10. až 36. dnem a 8,6 % krav až po této době. Po první inseminaci zabřezlo 53,1 % ošetřených kusů při průměrné terapeutické service periodě (TSP) 22 dny. U nezabřezlých krav došlo po první inseminaci k normalizaci cyklu.

Hoechst (1979) uvádí v informacích o preparátu Receptal, který je analogem Gn-RH, že z 373 krav a jalovic s acyklií a anestrem zabřezlo 84,7 % ošetřených, z toho 45,3 % po první inseminaci, 29 % po druhé inseminaci a 10 % po třetí inseminaci. U krav s poruchami ovulace zabřezlo po první inseminaci 63,9 % kusů.

METODIKA

Dirigestrano Spofa — syntetického Gn-RH československé výroby s obsahem 50 µg gonadorelinu v 1 ml preparátu — bylo použito k ovlivnění ovariálních funkcí u 121 krávy s děletrvajícími poruchami zabřezávání ve třech chovech s nízkou plodností. V době aplikace preparátu byla březost po první inseminaci v těchto chovech 37,1%, 32,0% a 32,3%, po všech inseminacích 31,0%, 30,2% a 39,2%, SP byla 108, 142 a 118 dnů a index zabřezávání 1,7, 2,6 a 2,3.

Po klinickém vyšetření bylo pro terapeutické ověření Dirigestrano vybráno 41 krav s diagnózou anestrus, u nichž nebyly zjištěny zevní příznaky říje a na vaječnicích nebylo možné palpat ani žluté tělísko, ani prominující folikul. U všech se po ošetření projevila říje a všechny byly inseminovány. Dále bylo ošetřeno 59 krav — přebíhalek s nepravidelnými cykly a 21 krav s nepravidelným průběhem říje, jejichž říje byly prodloužené a přetrvávaly déle než 24 hodiny se suspektní diagnózou perzistujícího folikulu, nebo u nichž se v předcházejícím cyklu projevily krátké říje se suspektní diagnózou atrezie folikulu.

Podle tělesné hmotnosti bylo krávám aplikováno v 61 případech 5 ml Dirigestrano i. m., v 62 případech 4 ml. Krávy přebíhalky s nepravidelnými cykly a krávy s nepravidelnými říjemi byly ošetřeny Dirigestranem hodinu až šest hodin před inseminací. Všechny aplikace byly jednorázové.

Po aplikaci přípravku byl sledován nástup říje, její průběh, intenzita zevních příznaků, datum první, druhé, resp. třetí inseminace, výsledek zabřeznutí na podkladě rektálního vyšetření. Z dosažených výsledků byla stanovena terapeutická service perioda (TSP), což je počet dnů mezi aplikací Dirigestrano a inseminací, po které krávy zabřezly. U ošetřených a inseminovaných krav byl stanoven inseminační index.

I. Výsledky terapeutického použití Dirigestranu (Gn-RH) při funkčních poruchách ovaríí — The results of the therapeutic use of Dirigestran (Gn-RH) in cases of the functional disorders of ovaries

Diagnóza	n	Březích po inseminaci						Zabřezlo celkem		Terapeutická service perioda (dnů)	Od porodu po aplikaci (dnů)
		první		druhé		třetí					
		n	%	n	%	n	%	n	%		
Anestrus	41	21	51,2	3	7,3	5	12,1	29	70,7	44	168
Nepravidelný cyklus, přebíhalky	59	31	52,5	15	25,4	4	6,7	50	84,7	37	149
Nepravidelné říje	21	13	61,9	3	14,2	2	9,5	18	85,7	35	157
Celkem	121	65	53,7	21	17,3	11	9,1	97	80,1	Ø 39	Ø 149

VÝSLEDKY A DISKUSE

Dirigestranu bylo použito k terapii 41 krav s diagnózou anestrus (resp. subestrus), z nichž 37 nevykázalo po porodu a čtyři po předchozích inseminacích rozeznatelnou říji a u nichž při klinickém vyšetření nebylo na vaječnicích zjištěno ani prominující žluté tělísko ani hmatný folikul jako příznak probíhajícího cyklu (tab. I).

Po jednorázové aplikaci 4 ml nebo 5 ml Dirigestranu se dostavila říje u 33 krav, tj. u 80,4 %, ze čtyř krav s anestríí po předchozích opakovaných inseminacích nedošlo k nástupu říje ani u jedné. Ze 37 krav s poporodním anestrem došlo tedy k nástupu říje u 33 kusů, tj. 89,1 %, a všechny byly v průměru za 32 dny po aplikaci Dirigestranu inseminovány; pouze u čtyř krav, tj. 10,8 %, k nástupu říje do 60 dnů po ošetření nedošlo a krávy byly vyřazeny z chovu.

Z celkového počtu 41 ošetřených krav v této skupině zabřezlo 21 kusů (tj. 51,2 %) po první inseminaci, tři kusy (tj. 8 %) po druhé inseminaci a pět kusů (tj. 12,1 %) po třetí inseminaci. Celkem tedy zabřezlo 29 krav, tj. 70,7 %.

Ze skupiny 37 plemenic s poporodním anestrem zabřezlo po ošetření celkem 78,3 % krav, z toho 56,7 % po první, 8,1 % po druhé a 13,7 % po třetí inseminaci. V této skupině byly inseminovány 33 krávy, tj. 89,1 %, u čtyř krav nedošlo k nástupu říje a čtyři krávy ani po třech opakovaných inseminacích nezabřezly a byly vyřazeny z chovu. Z 29 zabřezlých koncipovalo 21 plemenic po první inseminaci (tj. 72,4 %), tři po druhé inseminaci (tj. 10,3 %) a pět po třetí inseminaci (tj. 17,2 %). Index zabřeznutí byl 1,44, průměrná TSP 44 dny, což je velmi uspokojivý výsledek, uvážíme-li, že v celém souboru ošetřených krav v této skupině uplynulo od porodu do ošetření Dirigestranem v průměru 168 dnů (tab. II).

Celkově je nutné hodnotit terapeutický efekt Dirigestranu u skupiny krav s poporodním anestrem jako výborný, ať se již uplatnil Gn-RH jako startér sistované ovariální činnosti, nebo jako stimulátor ovariálních

II. Výsledky použití Dirigestranu (Gn-RH) při ošetření krav — The results of the use of Dirigestran (Gn-RH) in the treatment of cows

	Krávy					
	neřící se		s nepravidelnými cykly		s nepravidelnými říjemi	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Ošetřeno krav	41		59		21	
Zabřezlo celkem	29	71,0	50	85	18	86,0
z nich zabřezlo po:						
1. inseminaci	21	72,4	31	62	13	72,2
2. inseminaci	3	10,3	15	30	3	16,6
3. inseminaci	5	17,2	4	8	2	11,1
Terapeutická service perioda (dnů)	44	—	37		35	
Od porodu po aplikaci GnRH (dnů $\emptyset$)	168	—	149		157	

funkcí. Zabřeznutí po první inseminaci bylo totiž o 19 až 24 % vyšší než březost po téže inseminaci normálně inseminovaných zdravých krav v těchto chovech a celkové procento zabřezlých krav s poporodním anestrém po aplikaci Dirigestranu — 78,3 % — je o 39 až 48 % vyšší než procento březosti po všech inseminacích v těchto chovech, jestliže v nich léčba nebyla provedena. V koncepci plemenic, které dostaly dávku 4 nebo 5 ml Dirigestranu, nebyly statisticky signifikantní rozdíly.

Ani u jedné z krav, u nichž se anestrus projevil až po opakovaných inseminacích při nepravidelných interinseminačních intervalech a u nichž byly zjištěny hladké a funkční vaječníky, se nepodařilo obnovit ovariální funkce, šlo však vesměs o krávy, které byly více než 200 dnů po porodu. Tato skupina ošetřených zvířat byla však málo početná a ze čtyř ošetření nelze vyvozovat závěry.

Syntetický Gn-RH (Dirigestran) byl experimentálně použit u 59 krav, které již byly neúspěšně inseminovány, jejich pohlavní cykly byly nepravidelné a měly negativní klinický nálezn na pohlavním ústrojí. Dirigestran v dávce 4 nebo 5 ml byl aplikován v den inseminace v rozmezí jedné až šesti hodin před inseminací. U krav, u nichž k aplikaci došlo těsně před inseminací a které se druhý den ještě říjely, byla provedena reinseminace. Krávy byly vzaty do léčby v průměru za 149 dnů po porodu. Po první inseminaci zabřezlo 31 krav, tj. 53 %, po druhé inseminaci 15 krav, tj. 25 %, a po třetí inseminaci čtyři krávy, tj. 7 %. Celkově zabřezlo 50 krav, tj. 85 %, a průměrná SP byla 37 dnů. Do 30 dnů po prvním ošetření Dirigestranem zabřezlo 46 krav, tj. 77,6 %.

Celkově je nutné hodnotit terapeutický efekt při této indikaci jako vynikající, protože zabřeznutí po první inseminaci bylo o 16 až 21 % vyšší než zabřezávání po téže inseminaci v těchto chovech bez ošetření a o 46 až 55 % vyšší než procento březosti po všech inseminacích na daných závodech.

V tomto souboru zabřezlo tedy 50 krav z 59 ošetřených, tj. 84,7 %, ze zabřezlých koncipovalo 62 % plemenic po první, 30 % po druhé a 8 % po třetí inseminaci. Nezabřezlo devět krav, tj. 15,2 %, z nich sedm bylo při aplikaci Dirigestranu déle než 180 dnů po porodu a všechny byly předtím více než pětikrát inseminovány, přičemž všechny interinseminální intervaly byly nepravidelné a byly delší než 25 dnů. Pěti plemenicím z těchto devíti nezabřezlých byla mezi porodem a aplikací Gn-RH ošetřována děloha pro nález chronické endometritidy, ale v době ošetření Dirigestranem nebyly prokázány klinicky zjiřitelné změny na pohlavním ústrojí.

Tak vysoká koncepce i při ošetření po pěti měsících po porodu je důkazem použitelnosti Gn-RH v chovech s nízkou úrovní zabřezávání.

Při experimentech nebyly zjiřtény signifikantní rozdíly v zabřezávání v závislosti na době aplikace Dirigestranu, tj. čtyři až šest hodin, dvě až čtyři hodiny nebo jednu až dvě hodiny před inseminací. Z 21 krav, které nezabřezly po první inseminaci, byl nástup další říje normalizován u 12 kusů, tj. u 57,1 %, a proběhl ve fyziologickém intervalu mezi 18 až 23 dny, u zbývajících plemenic byl nástup říje opět nepravidelný.

Dirigestran byl dále použit u 21 krav s dlouhotrvající říjí, u nichž byl zjiřtěn ještě v následujícím dnu přetrvávající folikul, nebo u nichž předchozí říje byla velmi krátká, krávy při ní nekoncepovaly a byla u nich stanovena suspektní diagnóza — atrezie folikulu. U krav s přetrvávající říjí byl Dirigestran aplikován druhý den říje, tj. jednu až šest hodin před inseminací, resp. reinseminací, u krav s předchozí krátkou říjí byl aplikován při následující říji jednu až šest hodin před inseminací. Z tohoto souboru 21 krav s poruchami ovulace zabřezlo celkem 18, tj. 85,7 %, a to 13 krav (61,9 %) po první inseminaci, tři krávy (14,2 %) po druhé inseminaci a dvě krávy (9,1 %) po třetí inseminaci. Mezi ošetřenými krávami byly i přebíhalky, což dokumentuje skutečnost, že průměrná doba od porodu do ošetření Dirigestranem činila 157 dnů. Průměrná doba od aplikace do inseminace, po které plemence v této skupině zabřezly, byla 35 dnů. Ze zabřezlých plemenic koncipovalo 72,2 % po první, 16,6 % po druhé a 11,1 % po třetí inseminaci.

Průměrná březost ošetřených krav po první inseminaci byla o 25 až 27 % vyšší než březost normálně inseminovaných zdravých krav v těchto chovech ve stejném časovém údobí, březost po všech inseminacích byla dokonce o 47 až 56 % vyšší u krav ošetřených Dirigestranem.

Ekonomika chovu skotu a výroby mléka nás v současné době nutí zabývat se vážnými problémy nízké úrovně reprodukčního procesu jak ve velkokapacitních chovech, tak i v chovech tradičních, a to hlavně v těch, ve kterých se zvýšila mléčná produkce. Je nutné hledat všechny cesty v oblasti výživy a organizace reprodukčního procesu, které by mohly ovlivnit úroveň reprodukce. Gamčík aj. (1980) definují anestrus jako stav, při němž se u plemenic neobjeví plnohodnotná říje. Patologický anestrus se podle těchto autorů vyskytuje hlavně postpartálně a postservisně. Tyto stavy negativně ovlivňují zejména délku service periody.

V řepařských oblastech pozorujeme stále častější přebíhání plemenic — nepravidelné reprodukční cykly se vyskytují až u 77 % krav (Rob a Klimeš, 1980), zvyšuje se frekvence krátkých a dlouhých

říjí. Při těchto stavech lze reprodukci v mnoha chovech úspěšně ovlivnit syntetickým Gn-RH, dobrých výsledků však nelze dosáhnout v chovech, ve kterých genitální sekrety vyvolávají spermiotoxicitu a emryotoxicitu [Rob aj., 1982].

Literatura

- ARBEITER, K.: Der Einfluss des gestörten Puerperalverlaufes auf die Reproduktionsleistung des Rindes. Prakt. Tierarzt, 8, 1975, s. 459-462.
- BREWSTER, J. E. — COLE, C. L.: The time of ovulation in cattle. J. Dairy Sci., 24, 1941, s. 111-115.
- GAMČÍK, P. — SAKALA, J. — LOJDA, L.: Plodnosť hovädzieho dobytku a jej poruchy. Bratislava, Príroda 1980.
- HANSEL, W.: The oestrus cycle in the cow. in: COLE, H. H., CUPPS, P. T.: Reproduction of domestic animals. New York, Academic Press 1959.
- HOECHST, F. M.: Receptal ad us. vet. Produktinformation, Zürich 1979.
- HOLTEMÖLLER, B.: Untersuchungen über die Anwendung von synthetischen Gonadotropin-Releasinghormon (Gn-RH) beim Rind. [Inaug. Diss.] Universität Giessen 1978.
- KARG, H.: Physiologische Grundlagen der Steuerung des Sexualzyklus. Tierzüchter, 22, 1970, s. 63-67.
- LOTTHAMMER, K. H. — AEHNELT, E.: Herdensterilität der Rinder. In: Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren. 5. Auflage. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag 1977.
- MADAN, M. L. — RAZDAN, M. N.: Studies of the reproductive behaviour of dairy cattle. I. Oestrus, functional activity of ovaries and ovulation. Indian J. veter. Sci., 37, 1967, s. 100-106.
- ROB, O. — KLIMEŠ, V.: Současné problémy výskytu poruch reprodukčního cyklu skotu, možnosti jejich diagnostiky a jejich ovlivnění pomocí analogu prostaglandinu F2 alfa ve VKK. Sborník ref., VŠZ Praha, 1980, s. 35-52.
- SCHAETZ, F.: Fruchtbarkeit beim weiblichen Rind. In: Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren. 5. Auflage. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag 1977.
- ŠIPILOV, V. S.: Základné smery intenzifikácie reprodukcie a prevencie neplodnosti hospodárskych zvierat. In: Reprodukcia hospodárskych zvierat. Sborník ref. V. Pribylove dni, Košice 1981, s. 8-12.
- TILLMANN, H.: Pathophysiologie der Fortpflanzung. In: SPORRI, H., STÜNZI, H.: Pathophysiologie der Haustiere. Berlin - Hamburg, Paul Parey Verlag 1969.
- ZAROBIN, K.: Ovulation, Ei- und Spermientransport. Schweiz. Arch. Tierheilkde, 111, 1969, s. 305-321.

Došlo dne 7. 5. 1982

Poznámka

Výzkum čs. přípravku Dirigestan inj. Spofa probíhal ve dvou etapách. V první etapě byla ověřována jeho účinnost při terapii ovariálních cyst; ve druhé etapě, která právě probíhá, je sledováno jeho využití při různých léčebných indikacích i v biotechnologii. Výsledky komplexního výzkumu budou postupně publikovány.

РОБ, О. — КЛИМЕШ, В. — РЕЙХЕЛ, Ф. — КОГОУТ, Л. — ЧЕП, К. (Сельскохозяйственный институт, Прага; Научно-исследовательский институт биофакторов и ветеринарных лекарств, Погоржи-Хотоун; Районная ветеринарная лечебница, Прага-восток): *Терапевтическое применение синтетического Gn-RH-Диригестрана при расстройствах полового цикла у коров в стадах с низкой плодовитостью*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 65-72.

Синтетический Gn-RH-Диригестран Спофа применили для обработки 121 коровы с функциональными расстройствами яичников. Из этого числа у 41 коровы ни после отела, ни после сервиса не появились признаки течки, 59 коров с нерегулярными циклами перегуливали и у 21 коровы установили нерегулярный ход течки. Обработку произвели в стадах с низким уровнем оплодотворяемости (32—37 % оплодотворения после первого осеменения, сервис-период составлял 108—142 дня). В общем итоге было оплодотворено 80,1 % от всех обработанных производителей, 53,7 % было оплодотворено после первого осеменения. Средний срок от обработки до осеменения, после которого коровы были оплодотворены, составлял 39 дней. Лечение было начато в среднем через 148 дней после отела. Средний индекс осеменения леченных и обработанных коров был 1,44. Из неимевших течку коров было оплодотворено 70,7 %, в том числе 51,2 % после первого осеменения при терапевтическом сервис-периоде (ТПС) 44 дня. Из перегуливающих коров с нерегулярным половым циклом всего было оплодотворено 84,7 %, после первого осеменения 52,5 % при ТСП 37 дней, а из коров с нерегулярным ходом течки было оплодотворено всего 85,7 %, после первого осеменения 61,9 % при среднем ТСП 35 дней. Всего у 82 % обработанных производителей проявились хорошо заметные симптомы течки после аппликации Диригестрана. Стельность всей совокупности (121 обработанной коровы) после первого осеменения была на 15—21 %, а после всех осеменений на 41—49 % выше, чем стельность нормально осемененных коров в этих стадах. Полученные результаты подтверждают, что лечение функциональных расстройств яичников годно и у коров в стадах со сниженной плодовитостью, в случаях, если у них не имеют место спермиотоксичность или эмбриотоксичность вследствие неадекватности секретов полового аппарата, вызванной неправильным питанием или инфекционными заболеваниями полового аппарата.

функциональные расстройства; терапия; крупный рогатый скот

ROB, O. — KLIMEŠ, V. — REICHEL, F. — KOHOUT, L. — ČEP, K. (University of Agriculture, Praha; Biofactor and Veterinary Drug Research Institute, Pohoří-Chotouň; District Veterinary Centre, Prague-East): *Therapeutic Use of Synthetic Gn/RH-Dirigestran in Cycle Disorders of Cows in Low-Fertility Herds*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 65-72.

Synthetic Gn-RH-Dirigestran Spofa was used for the treatment of 121 cows with functional ovarian disorders. Out of this total number, 41 cows showed no post-partal and no post-service symptoms of oestrus, 59 returned to oestrus with irregular cycles, and 21 cows showed an irregular course of oestrus. The treatment was made in herds with a low conception rate (32—37 % conceptions after the first insemination, service period 108 to 142 days). On the whole, 80.1 % of the treated cows got in calf, 53.7 % conceived after the first insemination. The average time from treatment to successful insemination was 39 days. The treatment was started 148 days from parturition, on an average. The average insemination index of the treated cows was 1.44. As to cows out of heat, 70.7 % got in calf on the whole and 51.2 % after the first insemination, the therapeutic service period (TSP) being 44 days. Out of the cows returning to oestrus with an irregular cycle, 84.7 % got in calf and 52.5 % got in calf after the first insemination with the TSP of 37 days, and the cows with irregular cycle the conception was recorded in 85.7 % (61.9 % after the first insemination with the average TSP of 35 days). On the whole, 82 % of treated cows showed clearly visible symptoms of oestrus after the application of Dirigestran. The pregnancy of the whole set (121 treated cows) was higher by 15 to 21 % after the first insemination and by 41 to 49 % after all inseminations, as compared with the pregnancy of normally inseminated cows in these herds. The results show that the treatment of the functional disorders of ovaries is also practicable in cows in herds with a decreased fertility if this treatment is not impaired

by spermiotoxicity or embryotoxicity owing to the effects of inadequate secretions of sexual organs caused by incorrect nutrition or infections.

functional disorders; therapy; cattle

Adresy autorů:

Doc. MVDr. Oldřich Rob, CSc., ing. Vlastibor Klimeš, Vysoká škola zemědělská, 160 21 Praha - Suchbát

MVDr. ing. František Reichel, CSc., Výzkumný ústav pro biofaktory a veterinární léčiva, Pohoří-Chotouň

MVDr. Luděk Kohout, MVDr. Karel Čep, Okresní veterinární zařízení, Praha-východ

ZMĚNY VYBRANÝCH BIOCHEMICKÝCH UKAZATELŮ KREVNÍHO SÉRA U ANESTRICKÝCH PRASNÍČEK

S. Navrátil, P. Forejtek, J. Raszyk, M. Štefan, M. Dvořák, M. Toulová, V. Mrva, J. Čanderle

NAVRÁTIL, S. — FOREJTEK, P. — RASZYK, J. — ŠTEFAN, M. — DVOŘÁK, M. — TOULOVÁ, M. — MRVA, V. — ČANDERLE, J. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Okresní veterinární zařízení, Hodonín): *Změny vybraných biochemických ukazatelů krevního séra u anestrických prasnic*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 73-80.

V užitkovém velkochovu se zvýšeným výskytem anestríí u prasnic byl hodnocen biochemický profil (hladiny vápníku, fosforu, hořčíku, chloridů, železa, aktivita alkalické fosfatázy — ALP, aminotransferázy aspartátu — AST, aminotransferázy alaninu — ALT, koncentrace celkové bílkoviny, albuminu, cholesterolu, močoviny, glukózy, vitamínu A a E) v krevním séru 40 anestrických a 40 kontrolních inseminovaných zvířat. U anestrických prasnic byly nalezeny průkazně nižší hladiny albuminu ($P < 0,01$), glukózy ($P < 0,01$), aktivity ALP ($P < 0,05$) a průkazně vyšší koncentrace močoviny ($P < 0,01$), vitamínu A ($P < 0,01$), vitamínu E ($P < 0,05$) a aktivity ALT ($P < 0,05$) ve srovnání s inseminovanými kontrolami. U dalšího souboru 22 anestrických a 20 zapuštěných prasnic bylo uskutečněno rozšířené enzymatologické vyšetření, spočívající v hodnocení aktivity ALP, AST, ALT a gama-glutamyl transferázy (GMT). U anestrických prasnic bylo zjištěno statisticky významné zvýšení aktivity AST ($P < 0,01$), GMT ($P < 0,01$), ALT ($P < 0,05$) a neprůkazné zvýšení aktivity ALP proti kontrolním zvířatům. Srovnáním zjištěných hodnot sledovaných biochemických kritérií s literárními údaji byla nalezena nižší koncentrace hořčíku a vyšší aktivita ALP a ALT u anestrických i inseminovaných zvířat obou vyšetřovaných souborů. Chemickým a mykologickým vyšetřením zkrmovaných krmných směsí byla zjištěna především vysoká kyselost tuku a střední až silné zaplísnění (*Mucor* sp., *Aspergillus* sp.). Histologickým vyšetřením vaječníků anestrických zvířat byly nalezeny cystózní degenerativní změny, proliferace fibrózních elementů a částečná atrofie kory ovarií. Byl vyvozen názor, že na vzniku zvýšeného výskytu anestríí se mohou podílet mykotoxiny, a to jednak přímým působením na pohlavní orgány, jednak narušením funkce jater, které se sekundárně podílí na vzniku ovariálních dysfunkcí.

ovariální dysfunkce; mykotoxiny; hepatopatie; enzymy

Zefektivnění chovu prasat, charakterizované především koncentrací velkého počtu zvířat, přináší s sebou nutnost věnovat větší pozornost a péči procesům rozmnožování. V intenzivním chovu prasat zaujímá totiž reprodukce klíčové postavení a na její úrovni do značné míry závisí hospodárnost a úspěch celého závodu.

Z faktorů, jež se nejvíce podílejí na ovlivňování reprodukčních funkcí prasnic, je nutné zdůraznit především vliv ustájení a výživy. Současné velkovýrobní podmínky však v těchto hlavních směrech nepůsobí

vždy optimálně. Velkovýrobní technologie nerespektují v potřebném rozsahu fyziologické požadavky jednotlivých kategorií prasat a ani kvalitativní krmných směsí pro výživu prasnic nebývá na žádoucí úrovni. Směsi neobsahují vždy potřebnou koncentraci živin, mají nízký obsah plnohodnotných bílkovin a esenciálních aminokyselin, jsou karentní na vápník, zinek a vitamíny A, D a E (Jagoš aj., 1981). Také zdravotní nezávadnost krmných směsí, především z hlediska cizorodých látek a plísňů, není vždy na uspokojivé úrovni (Korček a Ofúkaný, 1981). Zmíněné faktory se mohou podílet na narušení vnitřního prostředí zvířat a na alteraci jejich reprodukčních funkcí (Jagoš aj. 1981; Pawel, 1981).

V našem sledování jsme provedli biochemickou depistáž ve velkochovu prasat se zvýšeným výskytem anestríí u prasniček se záměrem determinovat případné změny vnitřního prostředí organismu, ke kterým při této funkční poruše dochází.

MATERIÁL A METODY

Sledování se uskutečnilo v užitkovém velkochovu s vlastním odchovem prasniček. V kategorii prasniček bylo v daném podniku umístěno měsíčně přibližně 400 zvířat, kříženek plemen Bu X L, resp. Bu X L X D. Zvířata byla ustájena v kotcích po deseti zvířatech a krmná dávka se skládala z podílu směsí ČOS 2, A₁, PCH a malého podílu směsí SOL.

Z těchto prasniček byl v prvním úseku sledování zjištěn biochemický profil u 40 anestrických zvířat a u dalších 40 kontrolních prasniček, které se řijely a byly inseminovány. V druhém úseku sledování jsme na základě dietetických rozborů krmných směsí a výsledků získaných biochemickou analýzou krevního séra opakovali a rozšířili enzymatologické vyšetření u 22 dalších anestrických a 20 kontrolních zvířat, abychom upřesnili údaje o jaterních funkcích.

Za anestrické prasničky byla považována zvířata, u nichž se do věku 280 dní nebo do hmotnosti 140 kg neprojevovala říje. Říje byla detekována dvakrát denně přítomností kance.

Krev pro biochemické analýzy jsme odebírali punkcí v. cava cranialis tři hodiny po ranním krmení, a to u anestrických prasniček po 280. dnu věku a u kontrolních zvířat za čtyři až sedm dní po inseminaci. Krev byla po hodině srážení odstředěna při 2500 otáčkách po dobu 15 minut a sérum bylo do doby stanovení (max. 24 hodiny) uloženo při teplotě 4°C.

Hodnocení biochemického profilu u prvního souboru zvířat zahrnovalo stanovení vápníku, fosforu, hořčíku, chloridů, železa, alkalické fosfatázy (ALP), aminotransferázy aspartátu (AST), aminotransferázy alaninu (ALT), celkové bílkoviny, močoviny a glukózy (ke všem těmto stanovením bylo použito Bio-La-testů Lachema), dále stanovení albuminu metodou podle Rodkeye (1965), detailně popsanou Dvořákem (1981), cholesterolu postupem podle Pearsona aj. (1953) s náhradou kyseliny p-toluensulfonové kyselinou sulfosalicylovou, a vitamínů A a E stanovených fluorometrickou metodou podle Thompsona aj. (1971, 1973). Enzymatologické vyšetření u dalšího souboru zvířat ve druhé fázi našeho sledování zahrnovalo stanovení aktivit ALP, AST, ALT a gama-glutamyltransferázy (GMT), hodnocených ve všech uvedených případech za použití Bio-La-testů Lachema. Fotometrická měření byla prováděna na spektrálním kolorimetru Spekol (Carl Zeiss, Jena) a fluorometrická měření na spektrálním fluorimetru Perkin-Elmer 204. Výsledky analýz byly matematicko-statisticky vyhodnoceny na Hewlett-Packardově počítači za použití metod běžných v biologické statistice. Průkaznost rozdílů aritmetických průměrů hodnot biochemických ukazatelů u dysfunkčních a kontrolních zvířat byla hodnocena Studentovým *t*-testem.

Ovaria odporažených anestrických prasniček byla fixována Bouinovým roztokem a zpracována běžnými postupy histologické techniky.

V průběhu sledování biochemických ukazatelů vnitřního prostředí zvířat byly uskutečněny chemické rozborů použitých krmných směsí podle ČSN 46 7007. Současně byly vzorky krmiva vyšetřeny i mykologicky (SVÚ Brno).

VÝSLEDKY

Výsledky vyšetření biochemického profilu u prvního souboru anestrických prasniček a u inseminovaných kontrolních zvířat shrnuje tab. I. U anestrických prasniček byly ve srovnání s inseminovanými kontrolami nalezeny průkazně nižší hodnoty albuminu ($P < 0,01$), glukózy ($P < 0,01$) a aktivity ALP ($P < 0,05$) a signifikantně vyšší hodnoty močoviny ($P < 0,01$) vitamínu A ($P < 0,01$), vitamínu E ($P < 0,05$) a aktivity ALT ($P < 0,05$).

I. Biochemický profil anestrických ($n = 40$) a inseminovaných ($n = 40$) prasniček — The biochemical profile of the anoestrous ($n = 40$) and inseminated ($n = 40$) gilts

Biochemický ukazatel	Jednotka	Anestrické prasničky ($\bar{x} \pm s$)	Inseminované prasničky ($\bar{x} \pm s$)	Průkaznost rozdílu (t -test)
Ca	mmol/l	$2,07 \pm 0,55$	$2,27 \pm 0,83$	statisticky neprůkazné
P	mmol/l	$2,28 \pm 0,35$	$2,28 \pm 0,27$	statisticky neprůkazné
Mg	mmol/l	$0,57 \pm 0,13$	$0,59 \pm 0,09$	statisticky neprůkazné
Cl ⁻	mmol/l	$95,11 \pm 14,36$	$94,48 \pm 6,41$	statisticky neprůkazné
Fe	$\mu\text{mol/l}$	$23,44 \pm 5,77$	$22,57 \pm 5,46$	statisticky neprůkazné
ALP	U/l	$68,02 \pm 16,90$	$78,55 \pm 23,10$	$P < 0,05$
AST	U/l	$18,66 \pm 4,43$	$19,18 \pm 3,59$	statisticky neprůkazné
ALT	U/l	$35,74 \pm 6,94$	$32,80 \pm 4,32$	$P < 0,05$
Celková bílkovina	g/l	$70,38 \pm 8,11$	$67,25 \pm 6,05$	statisticky neprůkazné
Albumin	g/l	$35,28 \pm 5,00$	$39,38 \pm 3,54$	$P < 0,01$
Cholesterol	mmol/l	$2,76 \pm 0,46$	$2,71 \pm 0,46$	statisticky neprůkazné
Močovina	mmol/l	$5,65 \pm 1,30$	$4,56 \pm 1,19$	$P < 0,01$
Glukóza	mmol/l	$4,65 \pm 0,97$	$5,15 \pm 0,81$	$P < 0,01$
Vitamín A	$\mu\text{mol/l}$	$0,95 \pm 0,72$	$0,56 \pm 0,12$	$P < 0,01$
Vitamín E	$\mu\text{mol/l}$	$2,92 \pm 2,16$	$2,11 \pm 0,53$	$P < 0,05$

II. Enzymatologická vyšetření druhého souboru anestrických ($n = 22$) a inseminovaných ($n = 20$) prasnic — The enzymatological examinations of the second set of anoestrous ($n = 22$) and inseminated ($n = 20$) gilts

Enzym	Jednotka	Prasničky anestrické ($\bar{x} \pm s$)	Prasničky inseminované ($\bar{x} \pm s$)	Průkaznost rozdílu (t -test)
Alkalická fosfatáza (ALP)	U/l	80,24 $\pm$ 45,64	66,18 $\pm$ 17,22	statisticky neprůkazné
Aminotransferáza aspartátu (AST)	U/l	24,80 $\pm$ 8,57	16,98 $\pm$ 2,23	$P < 0,01$
Aminotransferáza alaninu (ALT)	U/l	33,53 $\pm$ 5,71	29,51 $\pm$ 5,46	$P < 0,05$
Gama-glutamyl-transferáza (GMT)	U/l	44,37 $\pm$ 20,18	27,93 $\pm$ 15,96	$P < 0,01$

Opakované a rozšířené enzymatologické vyšetření [tab. II], uskutečněné na dalším souboru anestrických a inseminovaných zvířat, ukázalo signifikantně vyšší aktivitu AST ($P < 0,01$), ALT ($P < 0,05$) a GMT ($P < 0,01$) v krevním séru anestrických prasnic ve srovnání s inseminovanými kontrolami. Zvýšení aktivity ALP u anestrických zvířat bylo statisticky neprůkazné.

Vyšetřením vzorků krmných směsí bylo zjištěno, že obsahem dusíkatých látek odpovídají výrobním recepturám kompletních směsí pro odchov prasat, mají však nízký podíl vlákniny, nepřipustnou kyselost tuku a střední nebo silný stupeň zaplísnění (*Aspergillus niger*, *Mucor* sp.).

Na ovarích odporažených anestrických prasnic převládal makroskopicky nález malých multiplních cyst nebo afunkčních ovarí. Histologické vyšetření vaječníků těchto zvířat ukázalo především cystózní degenerativní změny a jen ojedinělý výskyt žlutých tělísek nebo jejich reziduí. Častý byl i nález proliferace fibrózních elementů podmiňujících částečnou atrofii kory vaječníků, popřípadě i větších částí orgánu.

DISKUSE

Anestrické stavy u prasat mohou být výsledkem celé řady nedostatků v ustájení, výživě, genetické selekci nebo v užitých biotechnických opatřeních a na jejich výskytu se mohou podílet i některé další faktory, např. vliv ročního období (Meredith, 1979; Rampacek aj., 1981; Christenson, 1981). Aby organizační nebo i terapeutická opatření byla účinná, je nutná analýza potenciálních příčin této funkční poruchy a vytypování faktorů, které se v daném případě na jejím vzniku nejvíce podílejí.

V případě našeho sledování jsme se zaměřili především na objasnění, zda se zvýšený výskyt anestríe u prasnic chovaných v užitkovém velkochovu projevuje ve změnách vnitřního prostředí zvířat a do jaké míry by případné odchylky biochemického profilu mohly informovat

o etiologických faktorech této funkční poruchy jako předpokladu účinných opatření k jejímu odstranění.

Srovnáním biochemického profilu sledovaných zvířat s obecně uznávanými klinickými limity vycházejícími z literárních údajů (Jagoš aj., 1981) i vlastních zkušeností pracoviště byla konstatována zvýšená aktivita enzymů ALP a ALT u anestrických i kontrolních inseminovaných prasnic. Podobně byla zjištěna v krevním séru obou sledovaných skupin zvířat i nižší hladina hořčíku.

Nález zvýšené aktivity enzymů ALP a ALT u sledovaných anestrických i kontrolních zvířat ve srovnání s klinickými limity těchto ukazatelů a zjištění průkazně vyšší aktivity ALT u anestrických prasnic v porovnání s inseminovanými zvířaty byly podnětem k opakování rozšířeného enzymatologického vyšetření jaterních funkcí u dalšího souboru zvířat. V tomto úseku sledování byly u anestrických prasnic nalezeny signifikantně vyšší aktivity AST, ALT a GMT. Rovněž aktivita ALP byla vyšší u anestrických prasnic, ale rozdíl nebyl statisticky průkazný. Přitom aktivita ALP a ALT byla u obou sledovaných skupin prasnic druhého souboru zvířat opět vyšší, než uvádějí literární údaje pro zdravá prasata (Jagoš aj., 1981).

Koncentrace albuminů v krevním séru má těsný vztah k obsahu bílkovin v krmné dávce (Dvořák, 1981). Při nedostatku bílkovin, jejich nedostatečném příjmu a při hepatopatiích se koncentrace albuminu v krvi snižuje. Zvýšená koncentrace močoviny v krvi pak odráží buď její zvýšenou syntézu při příjmu krmiva bohatého na bílkoviny, nebo naopak je důsledkem příjmu krmiva s bílkovinami neplnohodnotnými (Raszyk aj., 1982). Lze tedy teoreticky uvažovat o tom, že anestrické prasnice mají nějakým způsobem narušený metabolismus bílkovin, a to buď jejich nedostatečným příjmem, nebo jejich nedostatečným využíváním. Klíčovou roli hraje pravděpodobně narušení funkce jater, jak to naznačují změny v aktivitách sledovaných enzymů.

Vyšší koncentrace vitamínů A a E v krvi anestrických prasnic proti inseminovaným zvířatům byla vysvětlena jejich zvýšeným či opakovaným podáváním za účelem zlepšení reprodukčních funkcí podle provozních zvyklostí zemědělského podniku. Skutečnost, že u některých anestrických prasnic byly zjištěny v krvi i několikanásobně vyšší hladiny vitamínů A a E a přesto u nich k plnohodnotné říji nedošlo, upozorňuje na nutnost cílevědomé, uvážlivé a hospodárné aplikace vitamínů. Nefyziologické zvýšení obou sledovaných vitamínů v krvi by mohlo naopak působit další rozladění metabolických funkcí, které opět mohou v konečném důsledku negativně ovlivňovat reprodukční funkce. Rovněž snížená glykémie se může negativně podílet na reprodukci, zejména na kvalitě ovulace.

Šrubař (1978) našel u neříjících se prasnic sníženou koncentraci hořčíku. My jsme však zjistili podobně snížené hladiny hořčíku při hodnocení biochemického profilu i u inseminovaných kontrolních prasnic. Etiologie a význam tohoto nálezu zůstávají nejasné. Snížená koncentrace hořčíku se vyskytovala také během laktace v krevním séru prasnic, které vykazovaly delší interval nástupu říje po odstavu (Čanderle aj., 1978).

Dietetické a mykologické rozbory krmných směsí, motivované především výsledky enzymatologických kritérií v obou sledovaných souboru

rech zvířat, vykázaly výrazné odchylky kvality hlavně z hlediska stupně zaplísnění a nepřipustné kyselosti tuku. Je známo, že mykotoxiny mohou zasahovat do reprodukčních funkcí, přičemž mladá zvířata jsou na jejich účinek citlivější než zvířata starší. Zástupce skupiny mykotoxinů, T₂-toxin, působí mimo afekce zažívacího ústrojí i atrofii ovaríí a uteru (Palyusik, 1978). U novorozených a odstavených selat mohou mykotoxiny (zearalenon, T₂-toxin, ochratoxin) vyvolat klinické symptomy hyperestrogenismu (Borníkol aj., 1981). Podle Pawla (1981) poškozuje zearalenon primárně především krevní a nervový systém a reprodukční orgány. O aktuálnosti této problematiky v našich podmínkách poskytuje informaci např. rozbor výsledků Státní veterinární správy SSR (1981), z něhož vyplývá, že v roce 1980 bylo z 5680 vyšetřených vzorků krmných směsí pro prasata 301 mykologicky závadných, fyzikálně chemicky byly závadné 1252 vzorky. Za první pololetí roku 1981 bylo z 3168 vyšetřených krmných směsí pro prasata 217 vzorků závadných po stránce mykologické a 602 po stránce fyzikálně chemické.

Z výsledků byl vyvozen závěr, že zvýšené aktivity enzymů ALP a ALT v krevním séru sledovaných anestrických i inseminovaných zvířat mohou být odrazem konzumu mykotoxinů a indikují funkční poškození jater, které je podle získaných biochemických nálezů výraznější u skupiny anestrických zvířat. Lze usuzovat, že kromě přímého působení mykotoxinů na pohlavní orgány se významnější porucha jaterních funkcí u neřících se prasniček sekundárně promítá ve výraznějším narušení pohlavních funkcí s klinickým projevem anestríe. Podstatu anestríe u sledovaných zvířat lze v návaznosti na morfologické nálezy spatřovat především ve funkční acyklii vaječníků, ale v některých případech nelze u dysfunkčních prasniček zcela vyloučit ani výskyt subestrických stavů. Souvislost poruch jaterních funkcí a sexuálních dysfunkcí u obou pohlaví je všeobecně uznávána a je způsobována především poruchou metabolismu steroidních hormonů (Ludvík, 1976; Horský a Presl, 1978; Trávníček aj., 1978).

Na závěr diskuse lze vyslovit několik obecně platných poznatků. Metabolický test je vhodným prostředkem k poznání stavu organismu i u anestrických prasniček. Interpretace výsledků nebývá jednoduchá a může být mimo jiné komplikována nutriční situací navozenou krátkodobým příjmem krmiv, neodpovídajícím věku zvířat a fázi reprodukčního cyklu. Ve snaze dosáhnout lepších produkčních výsledků se často bez racionálních podkladů zvyšuje nabídka dusíkatých látek a vitamínů, obvykle neúčinně a nehospodárně. Na druhé straně se přehlíží potřeba krýt nutriční energii, což je důležité před ovulací. Biochemickým vyšetřením krevního séra, včetně stanovení aktivit diagnosticky významných enzymů, lze vyslovit podezření na určité závady. A ty by měly být dalším šetřením, včetně postmortálního, potvrzeny nebo vyloučeny. V této souvislosti je také třeba zdůraznit potřebu stanovení hlavních mykotoxinů v krmivech. V případech anestríe je ovšem nutné prověřit také celý systém odchovu prasniček.

Autoři děkují MVDr. J. Beránkovi, CSc., z SVÚ Brno za mykologické a chemické vyšetření vzorků krmných směsí a J. Paarové, H. Hornichové a V. Hegerové z VÚVeL za technickou spolupráci.

Literatura

- BORNIKOL, H. — GRUBER, S. — THALMANN, A.: Hyperöstrogenismus durch Fusariumtoxine bei neugeborenen und abgesetzten Ferkeln. *Tierärztl. Umsch.*, 36, 1981, č. 2, s. 94-105.
- ČSN 46 7007. Výživná hodnota krmiv. 1966.
- CHRISTENSON, R. K.: Influence of confinement and season of the year on puberty and estrous activity of gilts. *J. anim. Sci.*, 52, 1981, č. 4, s. 821-830.
- ČANDERLE, J. — NAVRÁTIL, S. — FOREJTEK, P. aj.: Metody veterinární péče u plemenných prasnic a kanců. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav vet. lékařství 1978. 40 s.
- DVOŘÁK, M.: Stanovení koncentrace albuminu v krevní plazmě prasat s použitím bromkrezolové zeleně. *Veter. Med. (Praha)*, 26, 1981, č. 8, s. 481-489.
- HORSKÝ, J. — PRESL, J.: Gynekologická endokrinologie. 1. vyd. Praha, Avicenum 1978. 553 s.
- JAGOŠ, P. — ILLEK, J. — ZÝKA, V.: Systém preventivní diagnostiky metabolických a produkčních poruch v chovech prasnic. SVS, oddělení veterinární osvěty, Pardubice 1981.
- KORČEK, M. — OFŮKANÝ, L.: Výživa a zdravotná problematika vo veľkochovoch ošípaných. In: Zbor. Štátnej veterinárnej správy MPVŽ SSR 9/10. Bratislava, Príroda 1981, s. 27-38.
- LUDVIK, W.: Andrologie. 1. vyd. Stuttgart, Georg Thieme Verlag 1976. 213 s.
- MEREDITH, M. J.: The treatment of anoestrus in the pig: A review. *Veter. Rec.*, 104, 1979, s. 25-27.
- PALYUSIK, M.: Die Bedeutung der Mykotoxine für den Gesundheitszustand der Haustiere. In: Aktuelle Probleme der landwirtschaftlichen Forschung. 4. Seminar — Mykotoxine in der landwirtschaftlichen Produktion. Landwirtschaftliche chemische Bundesversuchsanstalt Linz/Donau, sv. 11, 1978, s. 11-32.
- PAWEL, O.: K diagnostice mykotoxikózy hospodářských zvířat. *Veterinářství*, 31, 1981, č. 11, s. 505-506.
- PEARSON, S. — STERN, S. — McGAVACK, T. H.: A rapid accurate method for the determination of total cholesterol in serum. *Analyt. Chem.*, 25, 1953, s. 813-814.
- RAMPACEK, G. B. — KRAELING, R. R. — KISER, T. E.: Delayed puberty in gilts in total confinement. *Theriogenology*, 15, 1981, č. 5, s. 491-499.
- RASZYK, J. — DVOŘÁK, M. — ČANDERLE, J. — TOULOVÁ, M.: Metabolický test u prasat. *Veterinářství*, 32, 1982, č. 8, s. 262-265.
- RODKEY, F. L.: Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clin. Chem.*, 11, 1965, s. 478-487.
- SRUBAŘ, B.: Studium použitelnosti biochemického vyšetřování krevní plazmy prasnic pro kontrolu jejich zdravotního stavu. [Habitační práce.] Brno 1978. 210 s. — Vysoká škola veterinární.
- Štátna veterinárna správa MPVŽ SSR: Rozbor výsledkov veterinárnej činnosti a hospodárenia s finančnými prostriedkami vo veterinárnej službe SSR za rok 1980. Bratislava 1981.
- Štátna veterinárna správa MPVŽ SSR: Rozbor výsledkov veterinárnej činnosti a hospodárenia s finančnými prostriedkami vo veterinárnej službe SSR za 1. polrok 1981. Bratislava 1981.
- THOMPSON, J. N. — ERDODY, P. — BRIEN, R. — MURRAY, T. K.: Fluorometric determination of vitamin A in human blood and liver. *Biochem. Med.*, 5, 1971, s. 67-89.
- THOMPSON, J. N. — ERDODY, P. — MAXWELL, W. B.: Simultaneous fluorometric determinations of vitamins A and E in human serum and plasma. *Biochem. Med.*, 8, 1973, s. 403-414.
- TRÁVNÍČEK, T. a kolektiv: Speciální patologická fyziologie. 1. vyd. Praha, Avicenum 1978. 563 s.

Došlo dne 1. 11. 1982

НАВРАТИЛ С. — ФОРЕЙТЕК, П. — РАШИК, Й. — ШТЕФАН, М. — ДВОРЖАК, М. — ТОУЛОВА, М. — МРВА, В. — ЧАНДЕРЛЕ, Й. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно; Районное ветеринарное управление, Годонин): Изменения некоторых биохимических показателей кровяной сыворотки у анестрических свинок. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983 (2): 73-80.

В пользовательном разведении с высоким распространением анестрии у свинок оценивали биохимический профиль (уровни кальция, фосфора, магния, хлоридов, железа, активность

щелочной фосфатазы — ALP, аминотрансферазы аспартата — AST, аминотрансферазы аланина — ALT, концентрацию белка, альбумина, холестерина, мочевины, глюкозы, витаминов А и Е) в сыворотке крови 40 анестрических и 40 контрольных осемененных свинок. У первых отмечены достоверно заниженные уровни альбумина ($P < 0,01$), глюкозы ($P < 0,01$), активности ALP ($P < 0,05$) и достоверно повышенные концентрации мочевины ($P < 0,01$), витаминов А и Е ($P < 0,01$, $P < 0,05$) и активности ALT ($P < 0,05$) по сравнению с осемененными контрольными группами. В другой группе из 22 анестрических и 20 слученных свинок проводили расширенные энзиматологические исследования, в течение которых подытоживали активность ALP, AST, ALT и гамма-глутамил трансферазы (GMT). У анестрических свинок отмечена повышенная в статистически значимом порядке активность AST ($P < 0,01$), GMT ($P < 0,01$), ALT ($P < 0,05$) и в недостоверном — активность ALP против контроля. Путем сопоставления величин этих биохимических критериев с данными литературы обнаружены более низкая концентрация магния и повышенная активность ALP и ALT у анестрических и осемененных свинок обеих исследуемых групп. Посредством химического и микологического исследований скормливаемых комбикормов установлены высокая кислотность жира, среднее и сильное заплеснение (*Mucor* sp., *Aspergillus* sp.). Гистологическое же исследование яичников анестрических свинок показало дегенеративные изменения кист, пролиферацию фиброзных элементов и частичную атрофию коры яичников. Предполагается, что в распространении анестрий могут участвовать микотоксины как путем непосредственного воздействия на половые органы, так и из-за расстройства функций печени, которое во вторичном порядке участвует в возникновении овариальных дисфункций.

овариальные дисфункции; микотоксины; гепатопатия; ферменты

NAVRÁTIL, S. — FOREJTEK, P. — RASZYK, J. — ŠTEFAN, M. — DVOŘÁK, M. — TOULOVÁ, M. — MRVA, V. — ČANDERLE, J. (Veterinary Research Institute, Brno; District Veterinary Station, Hodonín): *Changes in the Selected Biochemical Parameters of Blood Serum in Anoestrous Gilts*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 73-80.

The biochemical profile [levels of calcium, phosphorus, magnesium, chlorides and iron, the activities of alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), and the concentrations of total protein, albumin, cholesterol, urea, glucose, and vitamins A and E] was studied in the blood serum of 40 anoestrous and 40 control inseminated animals in a production herd with an increased occurrence of anoestrus in gilts. The anoestrous gilts showed significantly lower levels of albumin ($P < 0.01$) and glucose ($P < 0.01$) and ALP activity ($P < 0.05$), and significantly higher concentrations of urea ($P < 0.01$), vitamin A ($P < 0.01$) and vitamin E ($P < 0.05$) and ALT activity ($P < 0.05$), as compared with the inseminated controls. An extended enzymatological examination consisting of the evaluation of the activities of ALP, AST, ALT and gamma-glutamyl transferase (GMT) was performed in another set of 22 anoestrous and 20 mated gilts. The anoestrous gilts showed a statistically significant increase in the activities of AST ($P < 0.01$), GMT ($P < 0.01$) and ALT ($P < 0.05$) and an insignificant increase in the activity of ALP in comparison with the control animals. The comparison of the obtained values of the studied biochemical criteria with literary data indicated a lower concentration of magnesium and a higher ALP and ALT activities in the anoestrous and inseminated gilts in both groups under study. A high acidity of fat and a medium to high fungus infestation (*Mucor* sp., *Aspergillus* sp.) were found by chemical and mycological examination of the administered feed mixtures. The histological examination of the ovaries of anoestrous animals showed cystically degenerative changes, proliferations of fibrous elements, and partial atrophy of ovarian cortex. It has been inferred from the observations that mycotoxins may be involved in the increase in the occurrence of anoestrus, either by a direct effect on sexual organs or by impairing the function of liver which, secondarily contributes to the rise of ovarian dysfunctions.

ovarial dysfunctions; mycotoxins; hepatopathy; enzymes

Adresy autorů:

MVDr. Stanislav Navrátil, CSc., MVDr. Pavel Forejtek, MVDr. Josef Raszyk, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., RNDr. Miriam Toullová, MVDr. Vlastimil Mrva, MVDr. Jiří Čanderle, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
MVDr. Miloslav Štefan, Okresní veterinární zařízení, 695 00 Hodonín

TERMOSTABILITA VAKCINAČNÍHO KMENE VIRU INFEKČNÍ BURZITIDY

K. Černík

CERNÍK, K. (Bioveta, n. p., Nitra): *Termostabilita vakcinačního kmene viru infekční burzitidy*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 81-88.

Vakcinační kmen viru infekční burzitidy, pomnožený v kulturách kuřecích embryonálních buněk, byl velmi odolný vůči teplu. Při teplotě 56 °C poklesl infekční titr viru (TKID₅₀) do dvou hodin o 0,9 log₁₀ a do pěti hodin o 1,2 log₁₀, ale ještě po 24 hodinách zůstal zachován infekční virus. Při teplotě 37 °C byl zaznamenán mírný pokles infekčního titru až po dvou dnech a do desátého dne se snížil o 1,2 log₁₀. Po 21 dnech byl virus téměř inaktivován. Při teplotě okolo 20 °C klesal infekční titr viru lineárně od třetího do dvanáctého týdne. Kontrolní vzorky uchovávané při teplotě +4 °C neztratily infekčnost tři měsíce a při teplotě -20 °C ani po šesti měsících. Diskuse se zabývá vlivem koncentrace bílkovin a chloridu hořečnatého v médiu na termostabilitu viru infekční burzitidy.

atenuovaný kmen viru infekční burzitidy; kuřecí embryonální buňky; cytopatický účinek; infekční titr TKID₅₀; inaktivační křivky; účinek teplot 56 °, 37 ° a 20 °C

Živá vakcína proti infekční burzitidě FYLORNIS, vyráběná z atenuovaného kmene Z-2037, se používá ve velkochovech drůbeže v ČSSR od roku 1981; před tím se více než rok podávala pokusně ve vybraných chovech na Slovensku. Vakcína se expeduje lyofilizovaná v ampulkách po 200 a 1000 dávkách nebo v tekutém stavu v lékovkách po 5000 vakcinačních dávkách. Podmínkou plné účinnosti vakcíny v terénu je zachování životnosti vakcinačního viru během dopravy a skladování, kdy na vakcínu může nepříznivě působit především zvýšená teplota.

Inaktivace živočišných virů teplem se jeví jako komplexní jev. Při vyšších teplotách obvykle probíhá dvojfázově, přičemž průběh obou fází je lineární. Tato skutečnost vedla Woesea (1960) k formulaci hypotézy, podle níž virová nukleová kyselina může existovat ve dvou životních formách a inaktivaci působí dva mechanismy. Jeden vyvolává kolaps sekundární struktury virionu, druhý jednoduchou chemickou reakcí v jediném místě řetězce nukleové kyseliny, která může mít základní biologický význam. Stanovení termostability viru patří k důležitým fyzikálním charakteristikám daného druhu nebo skupiny virů a často slouží k diferenciaci jednotlivých izolátů, linií a kmenů v rámci téhož druhu. Z tohoto hlediska byly podrobně studovány polioviry (Youngner, 1957), viry varioly a vakcinie (Hahon a Kozikowski, 1961; Kaplan, 1958), adenoviry (Rafajko a Young, 1964), viry chřátky (Frösner a Gerth, 1972), virus slintavky

a kulhavky (Bachrach aj., 1957), Kloboukovy choroby (Žuffa, 1962), infekční hepatitidy psů (Petr a Jiran, 1969), infekční bronchitidy kuřat (Singh a Cunningham, 1978) a v neposlední řadě virus pseudomoru drůbeže (Hanson aj., 1949; Hanson, 1975; Picken, 1964). Na našem pracovišti jsme věnovali zvláštní pozornost možnosti diferenciaci kmenů a terénních izolátů viru pseudomoru drůbeže pomocí inaktivace infekčnosti a hemaglutinační aktivity teplem (Černík, 1966; Černík aj., 1972; Hrdá aj., 1981).

Virus infekční burzitidy se vyznačuje vysokou odolností vůči teplu a různým vlivům vnějšího prostředí (Benton aj., 1967a, b; Dorn, 1969; Cho, 1967; Kösters, 1972; Landgrafová aj., 1967). Na základě těchto údajů byla testována udržitelnost lyofilizované a tekuté vakcíny proti infekční burzitidě za podmínek doporučeného skladování (Černík, 1982). Bylo zjištěno, že dlouhodobé skladování lyofilizované vakcíny FYLORNIS při chladničkové teplotě až do tří let nemá nepříznivý vliv na obsah živého viru. Tekutou vakcínu je možné skladovat v zmrazeném stavu při teplotě -20°C až deset měsíců bez ztráty infekčnosti.

Předmětem této pokusné práce bylo určit stabilitu vakcinačního kmene viru infekční burzitidy při vyšších teplotách prostředí.

MATERIÁL A METODY

VIRUS

Kmen Z-2037 viru infekční burzitidy, izolovaný v roce 1977 na ŠVÚ Zvolen z lymfatického aparátu infikovaného kuřete linie Shaver (Časnocha, 1980), byl pasážíován desetkrát v kuřecích zárodkách prostých protilátek proti viru infekční burzitidy a atenuován 27 sériovými pasážemi v kulturách kuřecích embryonálních buněk. V současnosti se používá k výrobě živé vakcíny proti infekční burzitidě FYLORNIS (Černík a Časnocha, 1980).

Virus byl pomnožen v kulturách kuřecích embryonálních buněk v Hankově médiu s 5% telecího séra a uvolněn z buněk opakovaným zmrazením při teplotě -20°C a rozmrazením. Vyčištěné a bakteriologicky sterilní kultivační médium obsahující virus bylo bez přídavku jiného konzervačního nebo ochranného prostředku sterilně rozplněno po 1 ml do ampulí, které byly zataveny.

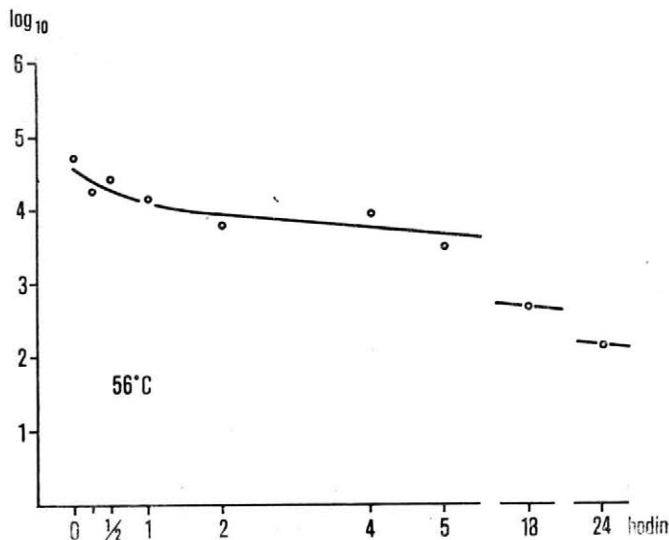
POSTUP

Část ampulí obsahujících infekční médium byla uložena do vodní lázně o teplotě 56°C , část do termostatu při teplotě 37°C a část byla ponechána při laboratorní teplotě cca 20°C . Kontrolní vzorky byly uloženy při chladničkové teplotě $+4^{\circ}\text{C}$ a v mrazicím pultě při teplotě -20°C .

V předem stanovených intervalech se odebíraly vždy dvě ampule, které byly ochlazeny v ledové vodní lázni a do vyšetření uchovávány při chladničkové teplotě. Obsah obou ampulí byl titrován jako jeden vzorek ve zkumavkových kulturách kuřecích embryonálních buněk. Infekční materiál byl ředěn desetinásobně do 10^{-7} a každé ředění bylo v objemu po 0,1 ml inokulováno do čtyř zkumavek s čerstvě založenými buněčnými kulturami. Titr viru byl odečítán po pěti dnech inkubace kultur při teplotě 37°C podle typického cytopatického účinku, projevujícího se tvorbou drobných kulatých buněk a postupným rozpadem buněčné jednovrstvy, a vypočítán podle Reeda a Muenche.

Tento postup byl opakován čtyřikrát při teplotě 56°C a třikrát při teplotách 37 a 20°C . Ze zjištěných logaritmických hodnot titrů byly vypočítány aritmetické průměry, které byly vyneseny do grafů.

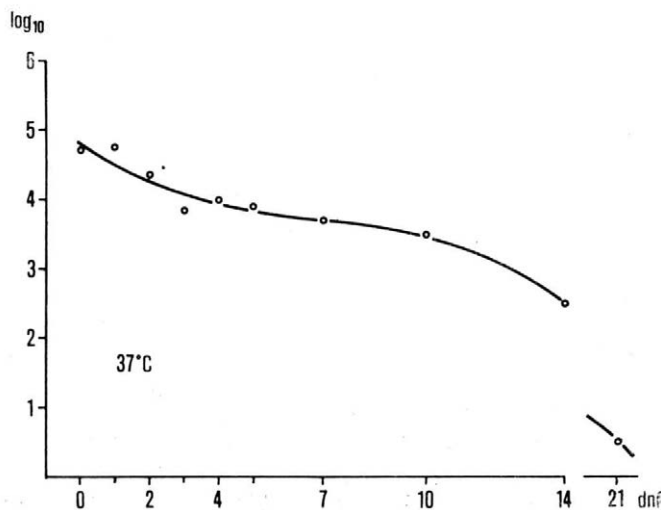
1. Pokles infekčního titru (TKID₅₀) vakcinačního kmene Z-2037 viru infekční burzitidy při teplotě 56 °C během 24 hodin — The decrease in the infection titre (TCID₅₀) of vaccination strain Z-2037 of infectious bursal disease virus at a temperature of 56 °C within 24 hours



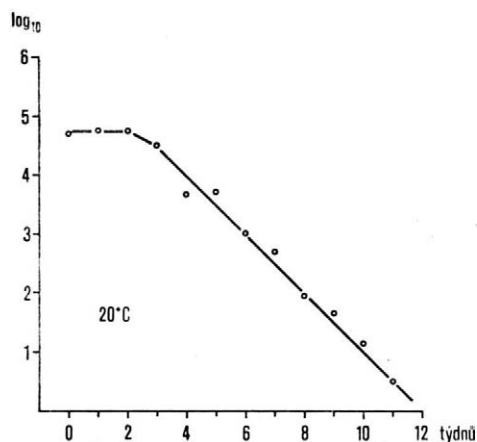
VÝSLEDKY

Při teplotě 56 °C poklesl infekční titr viru (TKID₅₀) z výchozí hodnoty 4,7 log₁₀ v 0,1 ml během první hodiny o 0,55 log₁₀, tj. 3,5krát (obr. 1). Tento pokles pokračoval a po dvou hodinách působení tepla dosáhl infekční titr průměrné hodnoty 3,8 log₁₀, tj. hodnoty 12,6násobně nižší než byla hodnota výchozí. Během dalších tří hodin se inaktivace viru významně zpomalila a do páté hodiny poklesl titr ještě dvojnásobně. Stejný sklon inaktivační křivky byl zachován i nadále a po 24 hodinách působení teploty 56 °C byl stanoven průměrný titr 2,14 log₁₀ v 0,1 ml, tj. 363krát nižší než výchozí titr.

Ve vzorcích virové suspenze uchovávaných při teplotě 37 °C byl první patrný pokles infekčního titru zaznamenán až po dvou dnech



2. Pokles infekčního titru (TKID₅₀) vakcinačního kmene Z-2037 viru infekční burzitidy při teplotě 37 °C během 21 dní — The decrease in the infection titre (TCID₅₀) of vaccination strain Z-2037 of infectious bursal disease virus at a temperature of 37 °C within 21 days



3. Pokles infekčního titru (TKID₅₀) vakcinačního kmene Z-2037 viru infekční burzitidy při teplotě okolo 20 °C během 12 týdnů — The decrease in the infection titre (TCID₅₀) of vaccination strain Z-2037 of infectious bursal disease virus at temperatures about 20 °C within 12 weeks

(obr. 2). Virus se zvolna inaktivoval až do desátého dne, kdy byl zjištěn průměrný titr 3,5 log₁₀, obsah infekčního viru byl tedy 16násobně nižší. Po deseti dnech uchovávání vzorků při teplotě 37 °C nastal zřetelný zlom inaktivační křivky, takže během dalších čtyř dní inkubace klesl titr o celý 1 log₁₀ a do 21. dne na hodnoty na hranici zachytivosti (0,5 log₁₀).

Při laboratorní teplotě okolo 20 °C zůstal infekční titr viru zcela zachován během prvních dvou týdnů (obr. 3). Od 14. dne však byl pozorován trvalý a téměř lineární pokles průměrných hodnot infekčního titru, takže po týdnu došlo ke stonásobnému snížení obsahu infekčního viru a virus se zcela inaktivoval do 12 týdnů.

Kontrolní vzorky viru uchovávané při teplotě +4 °C nevykázaly ztrátu infekčního titru do tří měsíců, ale do šesti měsíců poklesl titr o 0,6 log₁₀, vzorky skladované při teplotě -20 °C neztratily na infekčnosti do šesti měsíců.

DISKUSE

Virus k pokusnému vyšetřování byl pomnožen a titrován v buněčných kulturách připravených z komerčních nasadových vajec pocházejících z konvenčního chovu nosnic, ve kterém byla dokázána významná hladina protilátek proti viru infekční burzitidy. Tím se vysvětluje nižší výchozí titr pro buněčné kultury v porovnání s výsledky uváděnými Časnochou [1980], který u téhož kmene dosahoval titr až 6,3 log₁₀ TKID₅₀ v 0,1 ml, tedy zjišťoval čtyřicetkrát vyšší obsah infekčního viru.

Ačkoliv se virus infekční burzitidy projevoval při zvýšených teplotách prostředí vždy jako mimořádně stabilní, určitý vliv na jeho přežívání měl obsah bílkovin v médiu. Zatímco infekční suspenze Fabriciových burz nevykázala významný pokles infekčnosti pro kuřata a kuřecí zárodky při teplotě 56 °C během pěti hodin (Benton aj., 1967a) ani při teplotě 60 °C po 30 a 90 minutách (Cho, 1967; Landgrafová aj., 1967), v suspenzi infikovaných embryí došlo během čtyř až pěti hodin při teplotě 56 °C k poklesu infekčního titru pro kuřecí zárodky o 0,35 až 1,13 log₁₀, tj. 2,2 až 13,5krát (Benton aj., 1967a).

Vysokou rezistenci viru vůči teplu i v prostředí poměrně chudém na bílkoviny, v alantoamniotických tekutinách ředěných v poměru 1:2 fyziologickým roztokem, dokázal Kösters (1972). Při teplotě 50 °C přežíval virus čtyři hodiny bez snížení titru, ale během dalších dvou hodin poklesl titr o 2 log₁₀. Při teplotě 56 °C klesla infekčnost pro kuřecí zárodky během první hodiny o 3 log₁₀, ale ještě po šesti hodinách byl v tekutinách dokazatelný infekční virus. Obdobných výsledků dosáhli Petek a Mandelli (1968), kteří zaznamenali po 30 minutách uchovávání viru infekční burzitidy při teplotě 60 °C pokles infekčního titru o 2 log₁₀.

Při porovnání s těmito údaji lze námi vyšetřovaný kmen pomnožený v buněčných kulturách hodnotit jako vysoko termostabilní, i když je možné přičíst přídavku 5 % telecího séra ke kultivačnímu médiu jistý protekční účinek na virus, který při teplotě 56 °C ztratil teprve po pěti hodinách 1,2 log₁₀ ze svého infekčního titru, obdobně jako virus v suspenzi embryí podle Benton a aj. (1967a). Kromě toho se ještě po 24 hodinách, kdy celkový pokles dosáhl 2,56 log₁₀, zachoval poměrně vysoký titr, odpovídající stavu po první hodině tepelné inaktivace, který uvádí Kösters (1972). Časnocha (1980) u téhož kmene Z-2037 nepozoroval snížení infekčního titru po jedné hodině působení teploty 56 °C. Porovnatelné výsledky uvádějí Lukert a Davis (1974), kteří adaptovali virus infekční burzitidy na buňky kuřecích embryonálních burz a ledvin. Infekční titr tohoto viru, stanovený v PFU . ml⁻¹, poklesl během 90 minut skladování při teplotě 56 °C o pouhé 0,2 až 0,3 log₁₀. Petek aj. (1973) přidali k viru infekční burzitidy, adaptovanému na kuřecí zárodky, 2,5 % fetálního telecího séra a zjistili, že po třech hodinách při teplotě 56 °C nedosahoval pokles infekčního titru pro buněčné kultury ani 0,5 log₁₀.

Podle Dorna (1969) přežíval virus infekční burzitidy v infikované podestýlce pět dní při teplotě 50 °C a inaktivoval se spolehlivě až po pěti dnech při teplotě 55 °C. Infikované nevyčištěné klece zůstávaly infekční pro vnímavá kuřata ještě po 122 dnech (Benton aj., 1967b). V našich pokusech byl virus zcela inaktivován při teplotě 37 °C až po třech týdnech a při laboratorní teplotě po 12 týdnech, přičemž do tří týdnů byl pokles titru zanedbatelný. Cho a Edgar (1969) uvádějí, že v homogenátu infikovaných burz přežíval virus při laboratorní teplotě 21 den a při teplotě -20 °C tři roky bez ztráty infekčnosti. Z těchto výsledků vyplývá příznačná stálost infekce virem infekční burzitidy v zamořených prostorách. Není tedy možné počítat s faktorem spontánní dekontaminace ani při velmi dlouhých intervalech mezi jednotlivými zástavami.

Byl popsán stabilizující účinek dvojmocných kationtů na celou řadu virů: enteroviry, adenoviry, virus SV 40, vakcinie (Wallis a Melnick, 1961; Wallis aj., 1962). Přídavek chloridu hořečnatého má praktický význam při skladování virových suspenzí a konzervaci očkovacích látek (von Bülow, 1964; Hopkins, 1967). Reovirus je roztokem chloridu hořečnatého nejen stabilizován, ale dokonce aktivován (Wallis aj., 1964). Larski (1965) zjistil, že chlorid hořečnatý zpomaluje inaktivaci kmenů La Sota a Roakin viru pseudomoru, ale při teplotě 37 °C se naopak zrychlila inaktivace kmene Roakin. Podobně u viru infekční burzitidy dokázal Kösters (1972), že po přidání stejného dílu chloridu hořečnatého k virové suspenzi se při teplo-

tě 50 °C postupně inaktivoval virus od první do šesté hodiny a po šesti hodinách představoval celkový pokles 4 log₁₀, při teplotě 56 °C byl virus téměř zcela inaktivován do dvou hodin, ačkoliv ještě po čtyřech a šesti hodinách byl průkazný.

Technicky spolupracovaly: Mária Pecháčová a Edita Horváthová.

Literatura

- BACHRACH, H. L. — BREESE, S. S. — CALLIS, J. J. — aj.: Inactivation of foot-and-mouth disease virus by pH and temperature changes and by formaldehyde. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 95, 1957, s. 147-152.
- BENTON, W. J. — COVER, M. S. — ROSENBERGER, J. K. — aj.: Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). *Avian Dis.*, 11, 1967a, č. 3, s. 438-445.
- BENTON, W. J. — COVER, M. S. — ROSENBERGER, J. K.: Studies on the transmission of the infectious bursal agent (IBA) of chickens. *Avian Diseases*, 11, 1967b, č. 3, s. 430-438.
- BÜLOW, V. v.: Untersuchungen über chemisch-physikalische Eigenschaften des Virus der aviären Encephalomyelitis (AE) mit besonderer Berücksichtigung der Reinigung und Lagerfähigkeit von AE-Virus-suspensionen. *Zbl. Veter.-Med.*, B, 11, 1964, s. 674-686.
- ČASNOCHA, E.: Izolácia cytopatogenných kmeňov vírusu infekčnej burzitídy kurčiat na bunkových kultúrach. *Veter. Med. (Praha)*, 25, 1980, č. 12, s. 725-732.
- ČERNÍK, K.: Vliv teploty na hemaglutinační aktivitu a infekciozitu některých kmenů NDV. I. Možnost charakteristiky kmenů různé virulence pomocí inaktivace teplem. *Veter. Med. (Praha)*, 11, 1966, č. 5, s. 321-328.
- ČERNÍK, K.: Stabilita vakcíny FYLORNIS[®] proti infekční bursitidě. *Imunoprofylaxia*, 1982, č. 2, s. 55-60.
- ČERNÍK, K. — ČASNOCHA, E.: Vývoj živé vakcíny proti infekční bursitidě — FYLORNIS[®] — laboratorní testování vakcinačního kmene. *Imunoprofylaxia*, 1980, č. 4, s. 3-25.
- ČERNÍK, K. — SITKOVÁ, M. — VALENTOVIČ, A.: K problematice výskytu pseudomoru v našich chovech drůbeže. *Imunoprofylaxia*, 1972, č. 2, s. 3-10.
- DORN, P.: Der Tierarzt berichtet. *Dtsch. Geflügelwirtsch.*, 32, 1969, s. 1446.
- FRÖSNER, G. G. — GERTH, H. J.: Hitzeempfindlichkeit von Hämagglutinin und Neuraminidase bei Influenza-A-Stämmen. *Arch. Virusforsch.*, 37, 1972, č. 2-3, s. 167-175.
- HAHON, N. — KOZIKOWSKI, E.: Thermal inactivation studies with variola virus. *J. Bact.*, 81, 1961, č. 4, s. 609-613.
- HANSON, R. P.: Newcastle disease virus. In: HITCHNER, S. B. — DOMERMUTH, C. H. — PURCHASE, H. G.: Isolation and identification of avian pathogens. Ithaca, NY, 1975, s. 160-173.
- HANSON, R. P. — UPTON, E. — BRANDLY, C. A. — aj.: Heat stability of haemagglutinin of various strains of NDV. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 70, 1949, s. 283-287.
- HOPKINS, S. R.: Thermal stability of infectious bronchitis virus in the presence of salt solutions. *Avian Dis.*, 11, 1967, s. 261-267.
- HRDÁ, M. — ZAJAC, J. — ČERNÍK, K.: Porovnanie termostability kmeňov vírusu pseudomoru hydiny, izolovaných na Slovensku. *Veter. Med. (Praha)*, 26, 1981, č. 4, s. 247-256.
- CHO, Y.: A study of infectious bursal disease and its control by immunization. PhD-Thesis, Suburn, 1967.
- CHO, Y. — EDGAR, S. A.: Characterization of the infectious bursal agent. *Poult. Sci.*, 48, 1969, s. 2102-2109.
- KAPLAN, C.: The heat inactivation of vaccinia virus. *J. gen. Microbiol.*, 18, 1958, s. 58-63.
- KÖSTERS, J.: Untersuchungen über die infektiöse Bursitis der Junghennen (Gumboro-Krankheit). [Habilitationsschrift.] Giessen 1972. 126 s. — Justus Liebig-Univ.
- LANDGRAF, H. — VIELITZ, E. — KIRSCH, R.: Untersuchungen über das Auf-

treten einer infektiösen Erkrankung mit Beteiligung der Bursa Fabricii (Gumboro Disease). Dtsch. tierärztl. Wschr., 74, 1967, s. 6-10.

LARSKI, Z.: The influence of magnesium chloride on the thermal inactivation rate of NDV. Bull. veter. Inst. Puławy, 9, 1965, č. 1-2, s. 1-7.

LUKERT, P. D. — DAVIS, R. B.: Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. Avian Dis., 18, 1974, č. 2, s. 243-250.

PETEK, M. — MANDELLI, G.: Proprietà biologiche di un reovirus isolato da un focolaio di malattia di Gumboro. Atti Soc. ital. Sci. Veter., 22, 1968, s. 875-879.

PETEK, M. — d'APRILE, P. N. — CANCELOTTI, F.: Biological and physico-chemical properties of the infectious bursal disease virus (IBDV). Avian Pathol., 2, 1973, s. 135-152.

PETR, G. — JIRAN, E.: Inaktivace viru infekční hepatitidy psů teplem. Veter. Med. (Praha), 14, 1969, č. 11, s. 643-651.

PICKEN, J. C.: Thermostability of NDV. In: HANSON, R. P. aj.: NDV — an evolving pathogen. Madison, Univ. Wisconsin Press 1964, s. 167-188.

RAFAJKO, R. R. — YOUNG, J. C.: Thermal and pH stability of adenovirus types 12, 14 and 18. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 116, 1964, č. 3, s. 683-685.

SINGH, I. P. — CUNNINGHAM, C. H.: Differentiation of avian infectious bronchitis virus isolates by thermal sensitivity. Avian Dis., 22, 1978, č. 3, s. 440-450.

WALLIS, C. — MELNICK, J. L.: Cationic inactivation of vacuolating virus (SV 40) in poliovirus suspensions. Tex. Rep. Biol. Med., 19, 1961, s. 701-705.

WALLIS, C. — YOUNG, C. — MELNICK, J. L.: Effect of cations on the thermal inactivation of vaccinia, herpes simplex, and adenoviruses. J. Immunol., 89, 1962, s. 41-46.

WALLIS, C. — SMITH, K. O. — MELNICK, J. L.: Rheovirus activation by heating and inactivation by cooling in $MgCl_2$ -solutions. Virology, 22, 1964, s. 608-619.

WOESE, C. R.: Thermal inactivation of animal viruses. Ann. N. Y. Acad. Sci., 83, 1960, s. 741-751.

YOUNGNER, J. S.: Thermal inactivation studies with different strains of poliovirus. J. Immunol., 78, 1957, s. 282-290.

ŽUFFA, A.: Inaktivácia vírusu Kloboukovej choroby teplem. Veter. Čas., 11, 1962, č. 2, s. 165-173.

Došlo dne 23. 8. 1982

ЧЕРНИК, К. (Биовета, нац. предпр., Нитра): Термостабильность вакцинационного штамма вируса инфекционного бурсита. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 81-88.

Вакцинационный штамм вируса инфекционного бурсита, размноженный в культурах куриных эмбриональных клеток, был очень устойчив к теплу. При температуре 56 °C инфекционный титр вируса (TKID₅₀) в течение 2 часов понизился на 0,9 log₁₀, а в течение пяти часов на 1,2 log₁₀, но еще спустя 24 часа инфекционный вирус сохранился. При температуре 37 °C отметили слабое снижение инфекционного титра лишь через два дня, а на десятый день он понизился на 1,2 log₁₀. Через 21 день вирус был почти инактивирован. При температуре около 20 °C инфекционный титр вируса линейно падал от третьей до двенадцатой недели. Контрольные пробы, хранившиеся при температуре +4 °C, не утратили инфекционность в течение трех месяцев, а при температуре -20 °C даже спустя шесть месяцев. Дискуссия посвящена влиянию концентрации белков и хлорида магния в среде на термостабильность вируса инфекционного бурсита.

атenuированный штамм - вируса инфекционного бурсита; куриные эмбриональные клетки; цитопатическое действие; инфекционный титр TKID₅₀; кривые инактивации; действие температур 56 °C, 37 °C и 20 °C

ČERNÍK, K. (Biovet, n. p. Nitra): The Thermostability of the Vaccination Strain of Infectious Bursal Disease Virus. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 81-88.

The vaccination strain of infectious bursal disease virus, multiplied in cultures of chick embryo cells, was very resistant to heat. At a temperature of 56 °C the infection titre of the virus (TCID₅₀) decreased by 0.9 log₁₀ within two hours and by 1.2 log₁₀ within five hours, but the virus remained infective still after 24 hours. At a temperature of 37 °C, a slight decrease in infection titre was recorded only after two

days and a decrease by 1.2 log₁₀ was recorded within ten days. After the 21st day the virus was almost inactivated. At a temperature of about 20 °C the infection titre of the virus decreased linearly from the third to the twelfth weeks. The control samples kept at +4 °C retained their infectivity for three months and at -20 °C even for six months. The discussion deals with the effect of the concentration of protein and magnesium chloride in the medium on the thermostability of infectious bursal disease virus.

attenuated strain of infectious bursal disease virus; chick embryo cells; cytopathic effect; infectious titre TCID₅₀; inactivation curves; effect of temperatures of 56 °C, 37 °C, 20 °C

Adresa autora:

MVDr. Karel Černík, CSc., Bioveta, 949 91 Nitra

STŘEVNÍ ANASTOMÓZA TECHNIKOU INVAGINACE BEZ SUTURY STĚNY U MALÝCH ZVÍŘAT

V. Kyllar, J. Dubská, P. Neuhybel

KYLLAR, V. — DUBSKÁ, J. — NEUHYBEL, P. (Vysoká škola veterinární, Brno): *Střevní anastomóza technikou invaginace bez sutury stěny u malých zvířat*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 89-96.

Na patnácti zdravých pokusných psech a dvou kočkách byla po resekci části ileálního úseku střeva provedena anastomóza end-to-end metodou invaginace kraniálního segmentu střeva do segmentu kaudálního bez sutury stěny střevní. Hojení bylo kontrolováno v několika časových intervalech po operaci klinickým a histopatologickým vyšetřením. Výhodou této techniky je především rychlost a snadnost provedení operace, malá tkáňová reakce s tvorbou minimálního množství adhezí a dále skutečnost, že při této metodě nedochází k zúžení průchodnosti střeva. Na základě dosažených výsledků i literárních údajů doporučujeme tuto techniku ke klinickému použití zvláště v případech, kdy je vzhledem k alteraci celkového zdravotního stavu významné zkrácení doby operace, a tím i narkózy, na minimum. Průběh hojení je však třeba dále ověřit u pacientů s indikací enterektomie.

pes; kočka; střevo; resekce; invaginační metoda

Jednou z relativně častých indikací k provedení chirurgického zákroku v dutině břišní je náhlá či chronická neprůchodnost střevní. Jestliže je stěna střevní značně porušena, tj. v případě, kdy vznikly ireversibilní změny, je indikována resekce alterovaného úseku střeva a spojení vzniklých zdravých konců tzv. střevní anastomózou. Larsen a Bellenger (1974) konkrétně určují tyto indikace pro anastomózu: gangréna střeva v důsledku přerušení krevního zásobení — např. strangulací, poranění stěny střevní, obstrukce, nereponovatelná intususcepce, tumory nebo jizvy jako následek poranění cév či stěny střevní a ischemie stěny střevní, spojená s trombózou cév.

Pro rekonstrukci stěny střevní se používá několika desítek modifikací tří základních metod střevní anastomózy: end-to-end, side-to-side a end-to-side. Všechny tyto metody a jejich modifikace mají četné nevýhody. Nevýhodou metody side-to-side, jak uvádějí Larsen a Bellenger (1974), je značná časová a technická náročnost, výrazná traumatizace stěny střevní a z toho vyplývající tvorba adhezí, poranění velkého množství drobných cév s krvácením do stěny střevní, narušení peristaltiky střeva a stagnace zažítiny v místě anastomózy. Metoda end-to-side je vhodná především ke spojování dvou střevních segmentů o nestejném průměru (Swaim a Martin, 1969). Inverzní metoda end-to-end s dvouetážovou suturou podle Grier (1975) není vhodná při spojování segmentů o malém průměru především pro významné zúžení

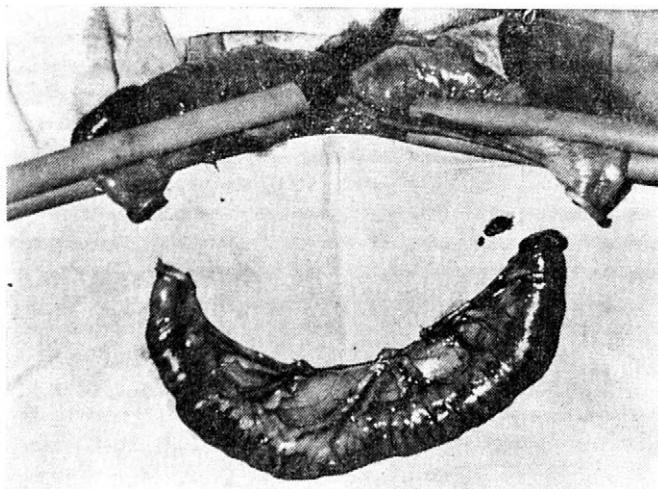
lumina a výraznější zánětlivou reakci uvnitř střeva. Lumen střevní nezužuje everzní metoda anastomózy end-to-end. Její nevýhodou je však častější výskyt adhezí a delší doba reparace sliznice (Tkáč aj., 1979; Ott a Doyle, 1968; Leighton, 1967). Zdá se, že většinu těchto nevýhod odstraňuje právě invaginační technika anastomózy end-to-end. Ve srovnání s klasickými metodami vyvolává minimální tkáňovou reakci s tvorbou minimálního množství adhezí, nezužuje lumen střevní, zachovává plnou funkčnost rekonstruovaného úseku střeva a splňuje i požadavky na rychlost zákroku. To byl také důvod, který nás k vyzkoušení této techniky formou experimentu vedl. O principu invaginace byla zmínka a byl hodnocen už v roce 1836 (jak uvádí Grier, 1968) a v r. 1897 byla invaginace použita k rekonstrukci cév (Grier, 1968). V poslední době se touto metodou zabývalo několik autorů. Např. Prasad (1972) ověřoval invaginační techniku anastomózy u 17 psů a srovnával ji s technikou inverzní. Na základě získaných výsledků považuje invaginační techniku za snadnější, spolehlivou a časově nenáročnou. Shuaib a Rebesko (1975) s úspěchem použili techniku anastomózy u devíti z jedenácti operovaných kusů, přičemž z kraniálního segmentu odstraňovali vrstvu serózy i svaloviny. Linn aj. (1966 — cit. Grier, 1968) řešili tuto techniku za použití chirurgických adheziv. Kontrolou za jeden až šest týdnů po operaci zjistili kompletní spojení stěny střeva v 75 % případů. Grier (1968) hodnotí 28 operací uskutečněných na 22 pokusných psech. U dvou ze tří pokusných skupin fixoval přiložené konce střev po invaginaci dvěma matracovými stehy. Pro její rychlost a jednoduchost ji doporučuje zvláště při komplexnějších chirurgických zákrocích. Šutta aj. (1971), stejně jako Frier (1966), vsunuli při invaginaci kraniální konec do konce kaudálního v rozsahu 5, resp. 3 mm bez podstatného opracování obou pahýlů. Vlastního spojení dosáhli jednoetážovou suturou pokračovacím stehem po celém obvodu stěny střevní. Vzhledem k malému rozsahu invaginace a šití stěny střevní připomíná tato metoda spíše end-to-end anastomózu prostou apozicí obou konců střeva, kterou Bennett a Zydeck (1970) hodnotí a porovnávají s metodou everzní a inverzní. Stejnou metodu popisuje i Grier (1975). Všichni autoři ji hodnotí jako rychlou, spolehlivou a jednoduchou.

MATERIÁL A METODA

Uskutečnili jsme 20 operací, a to na 15 klinicky zdravých pokusných psech ve věku jeden až devět roků a o hmotnosti 4 až 15 kg a na dvou pokusných kočkách tři a čtyři roky starých. Zvířata byla operována v celkovém úplném nectilivění Pentobarbitalem nebo Halothanem po úvodní aplikaci Thiopentalu standardní aseptickou operační technikou. Předoperační příprava spočívala ve 24hodinové hladovce a minimálně dvouhodinovém žíznění a v aplikaci antibiotik již 24 hodiny před operací. Pooperační péče spočívala ve dvoudenní hladovce. Po tuto dobu byl i. v. podáván výživný roztok (Ringerův roztok, Glyphostan, glukóza, B-komplex a celaskon) v množství 30 ml na kg ž. hm.

Vlastní anastomózu jsme dělali po laparotomii v *linea alba* asi 10 cm od *ostium ileocecale*. Po určení směru pasáže zažitiny byl resekován úsek ileálního střeva v délce 3 až 10 cm obvyklou operační technikou (obr. 1). Následovalo odstřížení mezenteria z kraniálního segmentu střeva v délce 2 až 3 cm, což odpovídalo rozsahu budoucí invaginace, a jeho klínovité vytnutí (obr. 2). Ve 14 případech byla z tohoto konce ve stejném rozsahu sloupnuta seróza (obr. 3). Vyhřezlá mukóza byla potom sestřižena tak, aby po vsunutí do kaudálního segmentu nebránila spojení

1. Resekce ileálního úseku střeva — Resection of the ileac section of the gut

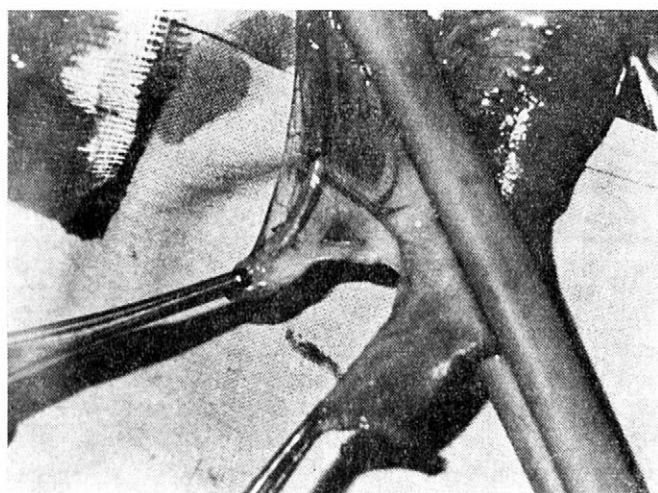


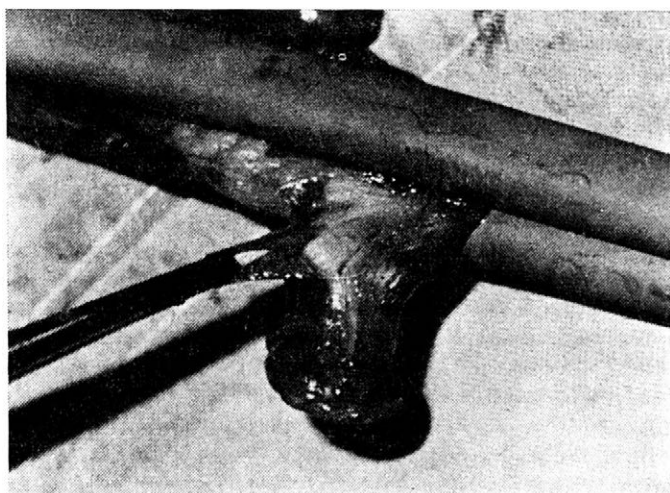
obou úseků stěny střevní. Z kaudálního segmentu byla po jeho everzi opět v rozsahu invaginace nůžkami excidována mukóza (obr. 4). Potom byly na okraj kraniálního segmentu založeny dva dočasné protilehlé catgutové stehy a byly protaženy stěnou kaudálního úseku ve vzdálenosti 2 až 3 cm od jeho okraje (obr. 5). Jemným tahem za oba stehy současně byl kraniální konec vtažen do kaudálního a takto držen po dobu, než bylo uzavřeno mezenterium pokračovacím stehem (obr. 6 a 7). Po repozici střevních kliček, včetně anastomózy, do dutiny břišní byly tyto stehy odstřiženy. Na stěnu střevní nebyla sutura zakládána. Dutina břišní byla uzavřena rutinním způsobem několikaetážovou suturou. Zvířata byla utrácena 7., 14., 28. a 60. den po operaci, makroskopicky byl posouzen stav hojení anastomózy a reakce tkáně na zákrok, úsek střeva s anastomózou byl resekován a podroben histopatologickému vyšetření. U tří psů jsme anastomózu dvakrát opakovali.

VÝSLEDKY

Z 20 operací 17 pokusných zvířat končily tři úhynem (psi). Pouze v jednom případě však bylo příčinou exitu vyklouznutí invaginovaného

2. Odstřižení mezenteria z kraniálního segmentu střeva — Cutting off the mesenterium from the cranial segment of the gut

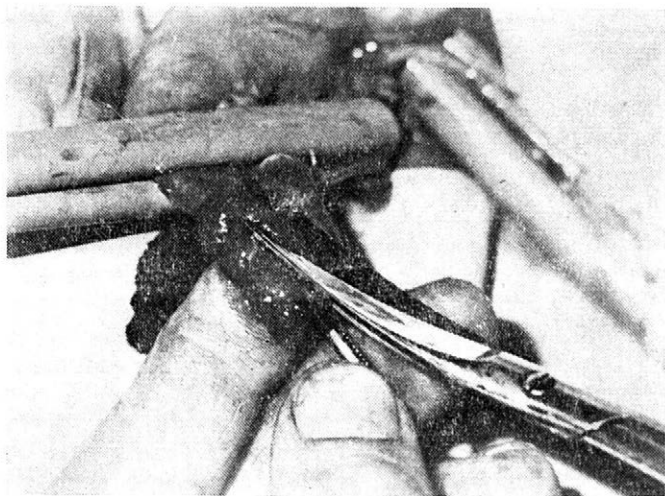




3. Sloupnutí serózy z kraniálního segmentu střeva — Separation of the serosa from the cranial segment of the gut

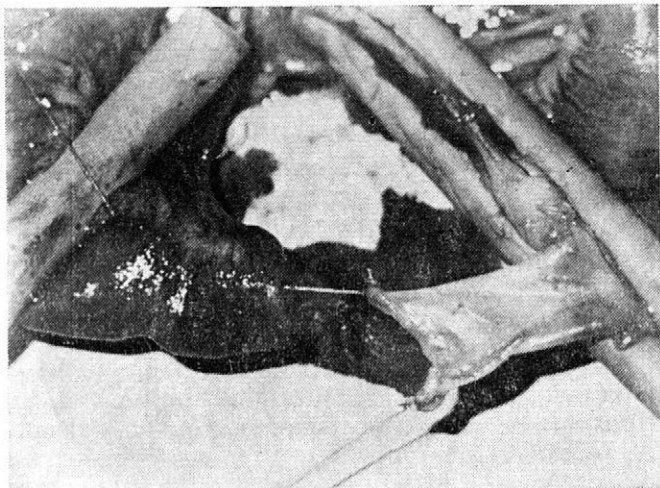
úseku střeva. V druhém případě došlo k úhynu šestý den po operaci na následky výhřezu střev po vykousání sutury stěny břišní. Třetí exitus nastal po úmyslé záměně obou konců (kaudální úsek byl invaginován do úseku kraniálního).

Makroskopickým vyšetřením bylo u všech ostatních případů a ve všech stádiích hojení zjištěno pevné spojení po celém obvodu anastomózy bez zúžení lumina střeva, odpovídající časovému odstupu od operace. V 60 % případů byla linie spojení na serózní ploše neznatelná, u ostatních byla tvořena fibrózní jizvou. Ve dvou případech bylo zjištěno divertikulární rozšíření kraniálně od místa spojení, způsobené tricho-bezoárem. U všech operovaných případů byly zjištěny mírné adheze omenta na stěnu střevní v místě anastomózy a v oblasti sutury mezenteria. V jednom případě byly zjištěny adheze mezenteria i omenta na střevní kličky. Ve dvou případech došlo k částečnému vysunutí invaginovaného konce, takže oba konce byly spojeny pouze v rozsahu 1 až 1,5



4. Excize mukózy po everzi stěny střevní z kaudálního segmentu — Excision of mucosa after the eversion of intestinal wall from the caudal segment

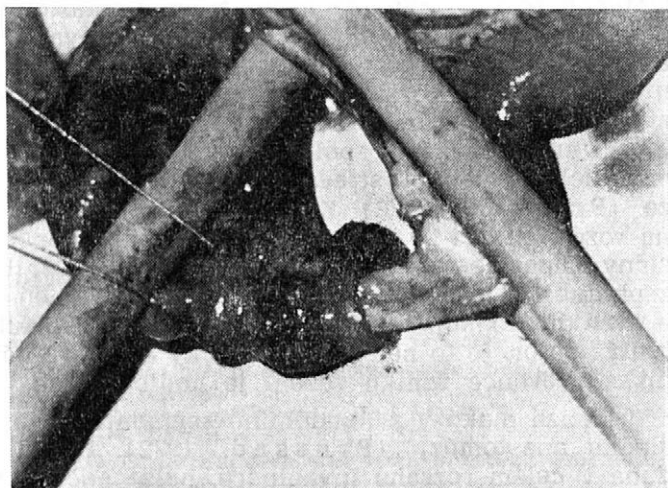
5. Založení dočasných stehů na okraj kraniálního segmentu — Temporary sutures at the edge of cranial segment



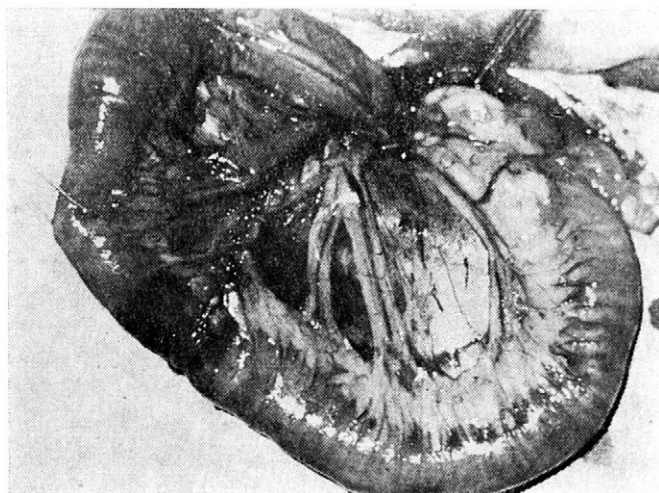
cm při zachování pevnosti anastomózy. Histopatologickým vyšetřením úseků střeva s anastomózou, odebraných týden po operaci, byla zjištěna granulační tkáň ve stadiu vaskularizace s hojným výskytem neutrofilních granulocytů. 14 dní po operaci byla přítomna granulační tkáň s perzistující zánětlivou reakcí, zatímco po čtyřech a osmi týdnech byla již granulační tkáň vyzrálá ve stadiu devaskularizace s dobře srostlou anastomózou.

DISKUSE

Předpokladem úspěšného zhojení anastomózy invaginační technikou a využití přednosti této techniky je dodržení několika důležitých zásad. Především je nutné správně určit směr pasáže zažitiny střevním traktem, resp. zorientovat se, na kterém úseku k zákroku dochází. Průměr střev-



6. Vtažení (invaginace) kraniálního segmentu do segmentu kaudálního jemným tahem za oba dočasné stehy — Invagination of the cranial segment into the caudal segment by finely drawing both temporary sutures



7. Dokončená invaginace i sutura mezenteria před repozicí do dutiny břišní — Finished invagination and suture of mesentery prior to reposition into the abdominal cavity

ních klíček nemusí být vždy spolehlivým kritériem. Tenké střevo může být dilatováno a tlusté naopak kontrahováno. Tlusté střevo je však obvykle světlejší a vrstva podélné svaloviny více prominuje. Obecně má kraniální jejunum silnější stěnu než střední úsek. Distální část ilea se dá snadno identifikovat podle cév jdoucích na *margo liber* stěny střevní. Pro orientaci může sloužit i *lig. duodeno-colum*, které je někdy považováno za adhezi (Grier, 1975). Frier (1966) doporučuje natáhnout na mezenteriu jednoho z pahýlů mezenteriální arterie stlačením a takem dvou prstů směrem proti toku krve, tj. k jejich bázi. Zůstanou-li arterie nezkroucené, natažené, jedná se o kraniální úsek. Podle našich zkušeností i podle některých literárních údajů (Šutta aj., 1971) je nejspolehlivější metodou vybavení všech klíček tenkého střeva až k jeho vstupu do kolonu. Negativním důsledkem je však výrazné dráždění přispívající později k tvorbě adhezí. Navíc je někdy tento postup vzhledem k výrazným změnám na stěně střevní zcela kontraindikován.

Dalším důležitým aspektem rozhodujícím o úspěchu operace je dostatečný rozsah invaginace. Po srovnání našich výsledků s literárními údaji (Grier, 1968; Prasad, 1972) považujeme z hlediska technického provedení a potřebné spolehlivosti za optimální invaginovat kraniální segment v rozsahu 2 až 3 cm. Krevní a fibrinové nahloučeniny mezi invaginovaným a kaudálním koncem střeva působí jako dočasný spojovací materiál, který společně se suturou mezenteria a normálními peristaltickými pohyby střeva udržuje invaginovaný konec v žádané poloze (Prasad, 1972). Z tohoto důvodu také nepovažujeme za nutné, na rozdíl od Griera (1968), fixovat oba konce po invaginaci suturou stěny. Omezuje se tím traumatizace stěny a vznik adhezí, což je jednou z předností této metody. Stejně tak nepovažujeme za nutné odstraňovat z kraniálního konce střeva serózu včetně muskulární vrstvy, jak uvádí tentýž autor. Je to nejenom technicky a časově náročná práce, ale z hlediska prevence vzniku zúžení je podle našich výsledků zbytečná.

Excize mukózy z kaudálního segmentu je podstatou konečného výsledku anastomózy (Prasad, 1972). Pokud není dokonale provedena v celém rozsahu invaginace, nelze počítat s rychlým a úspěšným

hojením. V takovém případě není možné doporučit tuto metodu jako výhodnější než konvenční techniky. Dosud se však nepodařilo najít vhodnou metodu, jak odstranit mukózu rychle a spolehlivě (Grier, 1968). Nedařilo se nám ani sloupnout mukózu po everzi stěny střevní, ani tupě odpreparovat sliznici bez everze stěny, jak to navrhuje Grier (1968). Za optimální způsob proto považujeme dokonalé vystříhání sliznice nůžkami, i když je to metoda pracná a nejvíce prodlužuje operační čas. Příčinou je křehkost sliznice a krvácení, které její odstranění doprovází. Při přetěti stěny střeva má sliznice mimořádně velkou tendenci vyhréznout přes okraj střevní stěny (Prassad, 1972). Proto úprava sliznice kraniálního segmentu, spočívající v jejím sestřížení, je neobyčejně důležitá, neboť kluzkost a sametový charakter sliznice může později způsobit vyklouznutí invaginovaného konce nebo nedosta- tečný efekt hojení díky její sekreční aktivitě. Tyto závěry jsou v souladu s našimi zkušenostmi. Smrt jednoho pacienta, způsobenou vyklouznutím anastomózy, připisujeme právě nedostatečnému upravení vyhrézlé sliz- nice kraniálního segmentu střeva. Stejně tak odstranění mezenteria z kraniálního segmentu v rozsahu invaginace a jeho klínovité vytěti po- važujeme za důležitou součást úpravy tohoto konce. Po vsunutí kraniál- ního segmentu do segmentu kaudálního musí být oba okraje mezente- riálního defektu přiloženy k sobě tak, aby jejich sutura byla jedním z faktorů udržujících anastomózu v žádané poloze. V průběhu našeho pokusu jsme neshledali rozdíly v hojení u anastomóz, při kterých byla seróza kraniálního segmentu sloupnuta, a u anastomóz, při kterých byla ponechána. Vzhledem k tomu, že makroskopickým i histologickým vy- šetřením nebylo zjištěno zúžení lumina, nepovažujeme za nutné serózu odstraňovat. Je to nejenom technicky náročné, ale z hlediska prevence vzniku zúžení nepodstatné. Naopak Grier (1968) uvádí, že odstraní-li se longitudinální vrstva svaloviny, funguje cirkulární vrstva jako svě- rač a způsobuje výrazné zúžení v místě anastomózy. Námi zjištěná tvor- ba adhezí při této metodě anastomózy je signifikantně menší než u tra- dičních metod se suturou stěny, při nichž jsou adheze obvyklou postope- rativní komplikací a příčinou mechanických obstrukcí (Prassad, 1972). Ve shodě s literárními údaji (Grier, 1968, 1975; Prassad, 1972; Larsen, 1974) připisujeme výrazně menší tvorbu adhezí mini- málnímu dráždění stěny, protože se nepoužívá šicí materiál, trauma- tizace je minimální a celá operace je rychlá. V neposlední řadě má na úspěšné a rychlé hojení anastomózy vliv pooperační péče, o níž jsme se již zmínili.

Literatura

- BENNETT, R. R. — ZYDECK, F. A.: A comparison of single layer suture patterns for intestinal anastomosis. J. Amer. veter. med. Assoc., 157, 1970, s. 2075-2077.
 FRIER, P. A.: A simplified method of intestinal anastomosis. Mod. veter. Pract., 47, 1966, č. 4, s. 72.
 GRIER, R. L.: Invaginační technika anastomózy tenkého střeva u psa. J. Amer. veter. med. Assoc., 153, 1968, č. 5, s. 528-532.
 GRIER, R. L.: Techniques for intestinal anastomosis. In.: BOJRAB, M. J.: Current techniques in small animal surgery. Philadelphia, 1975, s. 119-125.
 LARSEN, L. H. — BELLENGER, C. R.: Stomach and small intestines. In.: ARCHI- BALD, J.: Canine surgery. California 1974, s. 590-603.

LEIGHTON, R. L.: Everting end-to-end intestinal anastomosis in the dog. *Veter. Med. small Anim. Clin.*, 62, 1967, č. 3, s. 239-248.

OTT, B. S. — DOYLE, M. D.: Intestinal single layer everted anastomosis. *J. Amer. veter. med. Assoc.*, 152, 1968, s. 1318.

PRASSAD, B. J.: Non-suture intestinal anastomosis by invagination. *J. small Anim. Pract.*, 13, 1972, č. 11, s. 641-649.

SHUAIN, D. — REBESKO, O.: Technika intestinální anastomózy u skotu bez sutury. *Acta veter. (Beograd)*, 25, 1975, č. 1, s. 25-30.

SWAIM, S. F. — MARTIN, D. P.: Open end-to-end anastomosis in the dogs. *J. Amer. veter. med. Assoc.*, 154, 1969, č. 6, s. 638-640.

ŠUTTA, J. — JANDA, J. — TKÁČ, J.: Sutúra čriev s malým lumenom zjednodušenou invaginačnou anastomózou. *Veter. Med. (Praha)*, 16, 1971, č. 10, s. 643-647.

TKÁČ, J. a kol.: Črevná anastomóza end-to-end metódou eversní sutúry u malých zvierat. In.: *Sb. referátů XIV. zasedání odborné sekce chirurgie, ortopedie a rentgenologie společnosti veterinárních lékařů. Ostrava, 1979, s. 65-76.*

Došlo dne 5. 4. 1982

КЫЛЛАР, В. — ДУБСКА, Я. — НЕЙГЫБЕЛ, П. (Ветеринарный институт, Брно): Кишечный анастомоз техникой инвагинации без шитья стенки у малых животных. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983 (2) : 89-96.

На пятнадцати здоровых подопытных собаках и двух кошках после иссечения части подвздошного участка кишечника произведен анастомоз стыковым методом инвагинации кра-ниального сегмента кишечника в каудальный сегмент без шитья кишечной стенки. Процесс заживания контролировали в нескольких интервалах времени после операции путем клинического и гистопатологического обследований. Преимущество этой техники заключается, прежде всего, в быстроте и несложности проведения операции, в слабой тканевой реакции и в образовании минимального количества сращений, а также в том, что при этом мето-де не бывает суживания просвета кишечника и его проходимости. На основе полученных результатов и данных литературы рекомендуем эту технику для клинического использо-вания особенно в случаях, когда ввиду болезненных изменений общего состояния здоровья важно сокращение срока проведения операции, а тем самым и наркоза, до минимума. Однако ход заживания нужно далее проверять у больных с индикацией удаления части кишки.

собака; кошка; кишечник; резекция; метод инвагинации

KYLLAR, V. — DUBSKÁ, J. — NEUHYBEL, P. (University of Veterinary Medicine, Brno): *Intestinal Anastomosis by the Invagination Technique without Gut Wall Suture in Small Animals*. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983 (2) : 89-96.

After resection of a part of the ileac section of the gut, end-to-end anastomosis was performed in fifteen healthy test dogs and two cats by the method of the in- vagination of the cranial segment of the gut into the caudal segment without gut wall suture. Healing was controlled in several time intervals after operation (by clinical and histopathological examination). The main advantage of this technique is the speed and easiness of operation and a small tissue reaction with the formation of a minimum amount of adhesions, combined with the fact that by this method the passage of the intestines is not reduced. On the basis of the results and literary data, this technique is recommended for clinical use mainly in those cases when, owing to an alteration of the general health state, minimum time is left for an operation and, thereby, for a narcosis. However, the course of healing should be further studied in patients with an indication of enterectomy.

dog; cat; intestine; resection; invagination method

Adresa autorů:

MVDr. Vladimír Kyllar, Jaroslava Dubská, MVDr. Petr Neuhybel, Vy- soká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

RYCHLÉ STANOVENÍ CHOLESTEROLU VE VAJEČNÉM ŽLOUTKU BIO-LA-TESTEM

I. Ingr, J. Simeonová

INGR, I. — SIMEONOVÁ, J. (Vysoká škola zemědělská, Brno): *Rychlé stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku Bio-La-testem*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 97-104.

Je navržen postup přímého jednostupňového stanovení celkového obsahu cholesterolu ve vaječném žloutku. Vzorky žloutku se ředěním upravují na formu vhodnou k využití diagnostického Bio-La-testu Cholesterol (výrobce Lachema, n. p., Brno, ČSSR), určeného ke stanovení cholesterolu v krevním séru. Částečně byl upraven i postup vlastního použití testu. Modifikace Bio-La-testu pro vaječný žloutek poskytuje výsledky s metodickou chybou 1,5 %. Doba potřebná k přípravě vzorku a vlastní analýze nepřesahuje 40 minut. Ověřením navrženého analytického postupu bylo zjištěno, že ve vaječném žloutku nosného hybrida Hisex kolísá obsah cholesterolu v průběhu snáškového období od 1,14 do 1,41 % hmotnosti.

přímé jednostupňové stanovení; čs. diagnostická souprava; spektrofotometrie; parametry metody; nosný hybrid Hisex

Cholesterol je řazen mezi rizikové výživové faktory a žloutek slepičích konzumních vajec patří k jeho nejbohatším zdrojům. Přestože se na denním obratu cholesterolu v lidském organismu podílí rozhodující měrou cholesterol endogenní (K a u n i t z, 1977), je ve světě opět věnována pozornost množství cholesterolu přijímaného potravou, jak je zřejmé i z jednání světového kongresu o hygieně výživy v roce 1981 (S z o k o l a y, 1981 — osobní sdělení). H a l a č k a aj. [1976] uvedli, že denní příjem cholesterolu v potravě do 100 mg nemá vliv na jeho hladinu v krevním séru, ovšem příjem v rozsahu 300 až 600 mg zvyšuje jeho hladinu asi o 30 mg ve 100 ml séra. Denní příjem 300 mg cholesterolu je pokládán za tolerované maximum, bylo však zjištěno, že ženy u nás přijímají až 600 mg a muži dokonce až 800 mg cholesterolu denně (H e j d a, 1981). Za této situace je zájem hygieniků výživy o cholesterol v potravě zcela oprávněný.

K serióznímu vyhodnocování příjmu cholesterolu potravou je nezbytné mít k dispozici správné aktuální údaje. Zatím jsou hygienikové výživy odkázáni na tabulkové údaje staršího data, které dnes především u obsahu cholesterolu ve slepičím vaječném žloutku již neodpovídají skutečnosti. To proto, že intenzifikace zemědělské produkce vajec vedla ke změnám jejich složení, včetně obsahu cholesterolu. B r e n d l aj. [1979] prokázali vyhodnocením literárních údajů z let 1956 až 1974, že obsah cholesterolu ve vejcích se snižoval a že je v nepřímém vztahu k užitkovosti nosnic. S e m j a n o v á a G r o m [1976] zjistili, že vztah

mezi intenzitou snášky a obsahem cholesterolu ve žloutku je dán hodnotou korelačního koeficientu $r = -0,62$. Z hlediska příjmu cholesterolu ve výživě lidí se tedy moderní zemědělská výroba vajec jeví příznivě.

Literární údaje o aktuálním obsahu cholesterolu ve vejcích jsou velmi sporadické, což je ovlivněno i možnostmi jeho stanovení. Předkládáme postup rychlého a nenáročného stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku, jehož využití by mohlo vést k získávání aktuálních podkladů pro hodnocení spotřeby vajec z hlediska hygieny výživy.

Analýzu cholesterolu v biologických materiálech z hledisek klinické biochemie obsáhle shrnul Zak (1977). V potravinářské analytice se ke stanovení cholesterolu nejvíce využívá barevné Liebermann-Burchardovy reakce a jejího spektrofotometrického vyhodnocení (Davídek aj., 1977). Toto stanovení předpokládá předchozí izolaci lipidů.

Jsou však publikovány stále nové postupy pro stanovení cholesterolu a jeho esterů v biologických materiálech. Nedeljkovičová aj. (1981) využily tenkovrstvé chromatografie s denzitometrickým vyhodnocením. Cholesterol lze rovněž stanovit fluorometricky (Badzio aj., 1975), plynovou chromatografií (Punwar, 1975; van Delden aj., 1981), enzymovou mikrometodou (Hoops a Kupkeová, 1978) a v poslední době je využívána zejména kapalinová chromatografie (Káneda aj., 1980; Tsai aj., 1980; Perkins aj., 1981). Všechny tyto metody jsou materiálově, přístrojově i pracově náročné.

Rutinní laboratorní kontrola jakosti potravin naopak vyžaduje minimální metodickou náročnost při respektování požadavků na správnost, přesnost a reprodukovatelnost výsledků. Poměrně vysoký obsah cholesterolu ve vaječném žloutku nevyžaduje v zásadě příliš citlivou a přístrojově náročnou metodu. Doposud jsme využívali Gisselova (1975) zkráceného postupu pro stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku. Je sice celkově jednoduchý, ale je nevýhodný pro časovou náročnost na extrakci a značnou spotřebu chemikálií, zejména octanu etylnatého.

Rychlé a snadné je použití enzymového barevného testu pro stanovení cholesterolu v potravinách včetně vaječného žloutku, který dodává západoněmecká firma Boehringer. Cholesterol je enzymově oxidován za vzniku peroxidu vodíku, který je využit k oxidaci metanolu na formaldehyd za působení katalázy, a ten s dalšími složkami reaguje za vzniku žlutě zbarveného lutidinu, jehož absorbance se měří. Využití testu v našich laboratořích je podmíněno devizovým nárokem.

Pro přímé jednostupňové fotometrické stanovení celkového obsahu cholesterolu v krevním séru je u nás úspěšně využíváno soupravy Bio-La-test Cholesterol, vyráběné a dodávané n. p. Lachema Brno. Autoři testu (Horňáková aj., 1974) využili ke vzniku barevné reakce s cholesterolem kyseliny 2,5-dimetylbenzensulfonové (Watson, 1960 — cit. Horňáková aj., 1974). Pokusili jsme se uplatnit tento u nás vyráběný a tudíž dostupný test k přímému stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku.

MATERIÁL A METODY

Použili jsme vajec od nosnic typu Hisex. Žloutky byly odděleny ručním vytloukáním a homogenizovány laboratorním mixérem. Pro analytickou studii byly připraveny směsné vzorky žloutků, k ověření vypracovaného postupu byla použita

jednotlivá vejce získaná v průběhu snáškového období od sledovaného souboru nosnic.

Hledali jsme použitelnost Bio-La-testu Cholesterol (Lachema, n. p., Brno) s různými úpravami vzorků žloutku i změnami postupu připojeného k soupravě. Pro srovnání jsme paralelně používali metodu podle Gissela (1975).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Bio-La-test byl vypracován výslovně pro krevní sérum a respektuje jeho vlastnosti včetně obsahu cholesterolu. Nezbytným předpokladem využití testu pro vaječný žloutek byla úprava žloutku do formy roztoku, který by se svými vlastnostmi i obsahem cholesterolu co nejvíce přiblížil krevnímu séru a který by pro stanovení mohl být dávkován ve stejných objemech (0,05 ml).

Po výpočtech a ověření vyhovělo těmto požadavkům ředění žloutku fyziologickým roztokem v poměru hmotností 1 : 4, popřípadě 1 : 3. Hmotnostní poměry byly zvoleny proto, že výchozí vzorek žloutku nelze přesně odměřovat objemově, nýbrž pouze navažováním. Výhodné je to i pro vyjadřování výsledků, poněvadž všechny dosavadní údaje jsou uvedeny v hmotnostních procentech cholesterolu vztažených na žloutek nebo na jedlý podíl vejce. V ostatním postupu lze použít rychlého a přesného

I. Výsledky paralelních stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku metodou podle Gissela (1975) a modifikovaným Bio-La-testem při různém ředění a při dvou rozdílných vlnových délkách — Results of parallel determinations of cholesterol in egg yolk by the method after Gissel (1975) and modified by the Bio-La-Test at different dilutions and at two different wave lengths

Paralelní stanovení — číslo	Vaječný žloutek A		Vaječný žloutek B		Vaječný žloutek C	
	% cholesterolu		% cholesterolu		% cholesterolu	
	metoda podle Gissela	modifikovaný Bio-La-test; ředění 1 : 4; 625 nm	modifikovaný Bio-La-test; ředění		modifikovaný Bio-La-test; měření při vlnové délce	
			1 : 3	1 : 4	625 nm	580 nm
1	1,43	1,19	1,18	1,27	1,19	1,29
2	1,01	1,17	1,18	1,27	1,19	1,29
3	1,22	1,17	1,17	1,23	1,21	1,33
4	1,02	1,17	1,19	1,25	1,20	1,30
5	1,05	1,17	1,15	1,21	1,21	1,33
6	1,30	1,22	1,19	1,25	1,21	1,33
7	1,07	1,18	1,18	1,25	1,20	1,29
8	1,34	1,16	1,19	1,27	1,20	1,32
9	1,29	1,16	1,23	1,27	1,21	1,30
10	1,29	1,19	1,20	1,23	1,19	1,30
$\bar{x}$	1,198	1,178	1,19	1,25	1,20	1,31
V (%)	12,5	1,5	1,9	1,7	1,3	1,5

pipetování, přičemž výsledek není ovlivněn, poněvadž měrná hmotnost fyziologického roztoku i zředěného žloutku se rovná přibližně hodnotě 1,00.

Ředění žloutku 1:4 a 1:3 poskytlo téměř shodné výsledky (tab. I), poněkud lepší reprodukovatelnost výsledků při větším zředění je možné vysvětlit vyšším zředěním ostatních doprovodných složek žloutku. Určité obavy vzbuzoval celkový obsah lipidů ve žloutku (více než 30 %), ovšem vysoký podíl heterolipidů, zejména lecitinu, způsobuje vysokou emulgovatelnost lipidů, takže při stanovení cholesterolu nevádí. Výsledný zředěný homogenát žloutku lze dávkovat mikropipetou stejně jako krevní sérum.

Autoři Bio-La-testu zvolili pro měření absorbance výsledného barevného roztoku vlnovou délku 580 nm, přestože absorpční maximum cholesterolu je při 625 nm. To proto, že sérum obsahuje bilirubin vyvolávající posun absorpčního maxima, kdežto při 580 nm je jeho vliv potlačen. V našem případě zmíněná interference nehrozí, poněvadž obsah bilirubinu ani biliverdinu není ve žloutku uváděn (Izák aj., 1977) a ani případný výskyt těchto látek ve stopách by vzhledem k obsahu cholesterolu nebyl překážkou. Porovnání výsledků měření při obou vlnových délkách (tab. I) je příznivé pro použití vlnové délky 625 nm, tedy hodnoty absorpčního maxima cholesterolu.

Modifikace Bio-La-testu pro stanovení cholesterolu ve žloutku při ředění vzorku 1:4 a při použití vlnové délky 625 nm byla konfrontována na jiném směsném vzorku s metodou podle Gissela (1975). Z porovnání je zřejmé (tab. I), že obě metody poskytly velmi blízké průměrné hodnoty, ale výsledky dosažené modifikovaným Bio-La-testem vykázaly nepoměrně lepší reprodukovatelnost ($V = 1,5 \%$). Gissel (1975) charakterizoval reprodukovatelnost výsledků při použití svého postupu hodnotou 2,9 %, ale nám se ani po dlouhém používání nepodařilo takové reprodukovatelnosti dosáhnout. S ohledem na podmínky měření jsme poněkud upravili i dávky činidla a kyseliny sírové, což pracovní návod k diagnostické soupravě umožňuje i při analýze séra.

Po úpravách a mnohonásobném ověření doporučujeme tento postup přímého stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku s využitím Bio-La-testu:

1. Příprava vzorku

Ručně oddělený žloutek bez zbytků bílku se homogenizuje laboratorním mixérem. Naváží se asi 5 g žloutkového homogenátu s přesností na 0,01 g a pipetováním se přidá čtyřnásobné množství fyziologického roztoku s přesností na 0,01 ml. Směs se důkladně promíchá.

2. Vlastní stanovení

Zředěný žloutkový homogenát se dává mikropipetou v množství 0,05 ml do suché zkumavky. Současně se připraví porovnávací roztok a standardní roztok cholesterolu (200 mg cholesterolu ve 100 ml, tj. 5,17 nmol v 1 litru) a postupuje se podle schematu Bio-La-testu takto:

	porovnávací roztok	standardní roztok cho- lesterolu	zředěný žloutkový homogenát
destilovaná voda	0,05 ml		
roztok cholesterolu		0,05 ml	
analyzovaný vzorek			0,05 ml
čínidlo	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

— po důkladném promíchání se nechá pět minut stát ve vodní lázni při teplotě 10 až 20 °C;

koncentrovaná kyselina sírová	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
----------------------------------	--------	--------	--------

— směs se promíchá a 10 minut se intenzivně chladí pod tekoucí vodou z vodovodu (teplota 10 až 15 °C), po této době se roztok přeleje do suché 1cm kyvety a ihned se na přístroji Spekol změří absorbance roztoku při 625 nm proti porovnávacímu roztoku; změří se rovněž absorbance standardu.

3. Výpočet

Hmotnostní procento cholesterolu ve vaječném žloutku se při ředění původního vzorku fyziologickým roztokem v poměru 1 : 4 vypočítá jako podíl absorbance měřeného vzorku (A) a absorbance standardu (B), při ředění vzorku 1 : 3 se výsledek násobí koeficientem 0,8:

$$\% \text{ (g cholesterolu ve 100 g žloutku)} = \begin{cases} = \frac{A}{B} & (1 : 4) \\ = \frac{A}{B} \cdot 0,8 & (1 : 3) \end{cases}$$

4. Doba stanovení

Včetně přípravy vzorku lze konečný výsledek při analýze jednoho vzorku získat do 40 minut. Efektivní je sériové stanovení s optimálním počtem 10 až 15 vzorků, protože se při analýze takové série celkový potřebný čas zhruba zdvojnásobí, ale jeho relativní potřeba na jeden vzorek se výrazně sníží.

Popsaný a doporučený postup jsme ověřili na individuálních vzorcích vajec, a to i ve srovnání s postupem podle Gissela (1975) v průběhu snáškového období (tab. II). Rozdíly ve výsledcích dosažených oběma postupy jsou velmi malé a neprůkazné i na hladině významnosti $P = 0,01$. Hodnoty variačního koeficientu zahrnují vedle metodické chyby (tab. I) i variabilitu individuální a konkrétní hodnoty jen podporují použitelnost modifikovaného Bio-La-testu pro tento účel. Měření absorbancí při obou zmíněných vlnových délkách přineslo nepatrné a naprosto neprůkazné rozdíly (tab. II).

II. Stanovení cholesterolu ve vaječných žloutcích nosnic Hisex v průběhu snášky
— Determination of cholesterol in egg yolks of Hisex layers during the laying period

Vaječný žloutek — číslo	Hmotnostní procento cholesterolu ve vaječném žloutku								
	3. měsíc snášky			4. měsíc snášky			8. měsíc snášky		
	podle Gissela	modifi- kovaný Bio-La- -test	rozdl	podle Gissela	modifi- kovaný Bio-La- -test	rozdl	modifikovaný Bio-La-test měření při		rozdl
							580 nm	625 nm	
1	1,47	1,37	-0,10	1,24	1,42	+0,18	1,39	1,44	+0,05
2	1,25	1,50	+0,25	1,30	1,32	+0,02	1,39	1,41	+0,02
3	1,81	1,62	-0,19	1,26	1,31	+0,05	1,49	1,41	-0,08
4	1,51	1,56	+0,04	1,23	1,26	-0,07	1,39	1,36	-0,03
5	—	1,24	—	1,09	1,20	+0,11	1,28	1,30	+0,02
6	—	1,38	—	0,90	1,10	+0,20	1,28	1,33	+0,05
7	1,43	1,41	-0,02	1,08	1,23	+0,15	1,28	1,33	+0,05
8	1,27	1,26	-0,01	0,95	1,19	+0,24	1,39	1,41	+0,02
9	1,23	1,41	+0,18	1,22	1,16	-0,06	1,28	1,27	-0,01
10	1,22	1,38	+0,16	1,06	1,10	+0,04	1,31	1,33	+0,02
$\bar{x}$	1,39	1,41	+0,02	1,14	1,23	+0,09	1,35	1,36	+0,01
V (%)	14,4	8,4		12,9	8,3		5,49	4,0	

I když nebylo cílem této práce hodnotit obsah cholesterolu ve vejcích, lze z výsledků dosažených při ověřování navrženého postupu odvodit, že obsah cholesterolu ve vaječných žloutcích nyní nejvýkonnějšího hybridu Hisex (Petrovská a Špaček, 1979) nepřesáhl v průběhu snáškového období 1,41 hmotnostních procent, což je mnohem méně, než uvádějí dosud užívané tabulky (Kronďlová — Škopková a Šmrha, 1965; Souci aj., 1969; Šmrha a Krupařová, 1980).

V případě, že předložený expeditivní postup stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku najde širší uplatnění, může přinést správné a aktuální údaje, které by byly podkladem pro hodnocení aktuálního výživového stavu naší populace z hlediska příjmu tohoto rizikového faktoru.

Literatura

- BADZIO, T. — WINNICKA, U. — SOLECKI, A.: Fluorometric microdetermination of cholesterol. Chem. analit., 20, 1975, č. 4, s. 701-705.
Bio-La-test Cholesterol. Návod k použití soupravy pro 150 stanovení cholesterolu v séru. Lachema Brno, 1980.
BRENDL, J. — KRUPAŘOVÁ, M. — KMÍNEK, M.: Über den Trend und Perspektiven des Cholesteringehaltes der Hühnereier im Weltmassstab. In: Sbor. VŠCHT Praha, E 50, 1979, s. 161-172.

- DAVIDEK, J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin. 1. vyd., Praha, Stát. nakladatelství techn. literatury 1977. 718 s.
- DELLEN, J. R. van — COZIJNSEN, J. L. — FOLSTAR, P.: The determination of the cholesterol content in ready-to-serve foods by gas-liquid chromatography. *Fd Chem.*, 7, 1981, s. 117-124.
- GISSEL, C.: Eine modifizierte und abgekürzte Methode zur Cholesterinbestimmung im Eidotter mit der Liebermannschen Farbreaktion. *Arch. Lebensm.-Hyg.*, 26, 1975, č. 2, s. 74-75.
- HALÁČKA, K. — KOTULÁN, J. — KREJČÍ, Z. aj.: Základy hygieny pro posluchače lékařství. 1. vyd., Praha, Státní pedagogické nakladatelství 1976. 372 s.
- HEJDA, S.: Stav výživy našeho obyvatelstva a její výhledová racionalizace včetně doporučených výživových dávek do r. 2000. Zpráva pro ČSAZ. 1981.
- HOOPS, M. — KUPKE, I. R.: Improved method for the enzymatic microdetermination of cholesterol in plasma lipoproteins. *J. Clin. Chem., Clin. Biochem.*, 16, 1978, s. 663-668.
- HORŇÁKOVÁ, M. — CHROMÝ, V. — HEYROVSKÝ, A.: Spektrofotometrické stanovení sérového cholesterolu. *Biochem. clin. bohemoslov.*, 3, 1974, č. 1, s. 27-34.
- IZÁK, Š. a kol.: Hygiena potravin III. Hydina, vejcia, divina, ryby. 1. vyd., Bratislava, Príroda 1978. 365 s.
- KANEDA, T. — NAKAJIMA, A. — FUJIMOTO, K. aj.: Quantitative analysis of cholesterol in foods by gas-liquid chromatography. *J. nutr. Sci. Vitaminol.*, 26, 1980, s. 497-505.
- KAUNITZ, H.: Repair function of cholesterol versus the lipid theory of arteriosclerosis. *Chem. Age India*, 1977, č. 18, s. 761-763.
- KRONDOVÁ-ŠKOPKOVÁ, M. — ŠMRHA, O.: Tabulky výživných hodnot potravin. 1. vyd., Praha, Stát. zdravotnické nakladatelství 1965. 576 s.
- Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik. Mannheim, Boehringer 1980.
- NEDELJKOVIC, D. — KRZALIC, L. — KASTRAPELI, N.: Quantitative determination of free cholesterol and cholesterol esters in the cerebrospinal fluid by the method of thin-layer chromatography. *Acta veter. (Beograd)*, 31, 1981, č. 2-3, s. 73-78.
- PERKINS, E. G. — HENDREN, D. J. — BAUER, J. E.: High performance reversed phase chromatography of cholesterol and cholesterol esters of human plasma lipoproteins. *Lipids*, 16, 1981, č. 8, s. 609-613.
- PETROVSKÁ, E. — ŠPAČEK, F.: Ukazatele kvality vajec nejrozšířenějších hybridů slepic nosného typu. *Živoč. Vyr.*, 24, 1979, č. 9, s. 651-658.
- PUNWAR, J. K.: Gas-liquid chromatographic determination of total cholesterol in multicomponent foods. *J. Assoc. off. analyt. Chem.*, 58, 1975, č. 4, s. 804-810.
- SEMĀNOVÁ, E. — GROM, A.: Štúdium obsahu cholesterolu vo vaječnom žltku. I. Obsah žltkového cholesterolu pri niektorých hybridných kombináciách sliepok znáskového typu. *Poľnohospodárstvo*, 22, 1976, č. 10, s. 975-980.
- SOUCI, S. W. — FACHMANN, W. — KRAUT, H.: Die Zusammensetzung der Lebensmittel-Nährwert-Tabellen. Stuttgart 1969. Band I, II.
- ŠMRHA, O. — KRUPAŘOVÁ, M.: Stručný výtah tabulek výživových hodnot poživatin. 2. přeprac. vyd. Brno 1980. 40 s.
- TSAI, L. S. — IJICHI, K. — HUDSON, C. A. aj.: A method for the quantitative estimation of cholesterol alpha-oxide in eggs. *Lipids*, 15, 1980, č. 2, s. 124-128.
- ZAK, B.: Cholesterol methodologies: A review. *Clin. Chem.*, 23, 1977, č. 7, s. 1201-1214.

Došlo dne 28. 12. 1981

ИНГР, И. — СИМЕОНОВА, Я. (Сельскохозяйственный институт, Брно): Быстрое определение холестерина в яичном желтке Био-Ла-Тестом. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983 (2): 97-104.

Предложен метод непосредственного одноступенчатого определения общего содержания холестерина в яичном желтке. Пробы желтка путем разбавления подготавливаются до тех пор, пока они оказываются пригодными для использования диагностического Био-Ла-Теста Холестерин (завод-изготовитель Лахема, нац. предпр., Брно, ЧССР), предназначенного для определения холестерина в сыворотке крови. Частично был модифицирован также метод собственного применения теста. Модификация Био-Ла-Теста для яичного желтка дает результаты с методической ошибкой 1,5 %. Время, необходимое для приготовления пробы, и сам анализ не превышают 40 минут. Проверкой предложенного аналитического метода

было установлено, что в яичном желтке гибрида Хисекс содержание холестерина во время яйцекладки колебалось от 1,14 до 1,41 массы:

непосредственное одноступенчатое определение; чехословацкая диагностическая установка; спектрофотометрия; параметры метода; яйценоский гибрид Хисекс

INGR, I. — SIMEONOVÁ, J. (University of Agriculture, Brno): *Rapid Determination of Cholesterol in Egg Yolk by the Bio-La-Test*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 97-104.

A technique of direct one-stage determination of the total cholesterol content in egg yolk is proposed. Yolk samples are treated by dilution into a form suitable for a diagnostic application of the Bio-La-Test Cholesterol (manufacturer Lachema, n. e., Brno, CSSR), designed for the determination of cholesterol in blood serum. The procedure of applying the bio-assay was partly modified. Modification of the Bio-La-Test for egg yolk provides results with a methodical error of 1.5 %. The time needed for sample preparation and the analysis itself does not exceed 40 minutes. It was found out by checking the proposed analytical procedure that in the egg yolk of the Hisex laying hybrid the content of cholesterol fluctuated from 1.14 to 1.41 weight percent during the laying period.

direct one-stage determination; Czechoslovak diagnostic set; spectrophotometry; parameters of method; Hisex laying hybrid

Adresa autorů:

Doc. ing. Ivo Ingr, CSc., ing. Jana Simeonová, Vysoká škola zemědělská, Zemědělská 1, 662 65 Brno

METODIKA EXTRAKTOV V DETEKCII REZÍDUI INHIBIČNÝCH LÁTOK V TKANIVÁCH NEVYHNUTNE ZABITÝCH OŠÍPANÝCH A TELIAT

P. Siklenka, J. Pleva, M. Baranová, P. Maľa, A. Poliaková

SIKLENKA, P. — PLEVA, J. — BARANOVÁ, M. — MAĽA, P. — POLIAKOVÁ, A. (Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice): *Metodika extraktov v detekcii rezíduí inhibičných látok v tkanivách nevyhnutne zabitých ošípaných a teliat*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 105-110.

Sledovali sme rozdiely v detekcii rezíduí inhibičných látok vo vzorkách tkanív nevyhnutne zabitých ošípaných a teliat. Vyšetrovali sme vzorky z pečene, srdca, obličiek a svaly z 30 ošípaných a 16 teliat. K detekcii boli použité pevné vzorky tkanív orgánov uložených na agarovú pôdu a extrakty z pevných vzoriek, nanášané do jamiek agarovej pôdy. Vzorky boli paralelne spracované mikrobiologickou difúznou metódou za použitia mikroorganizmov *S. aureus* CCM 2022 a *B. subtilis* CCM 1999. Metódu získavania extraktov z pevných vzoriek orgánov sme navrhli a overili na vlastnom pracovisku. Prítomnosť inhibičných látok sa prejavovala tvorbou inhibičných zón. Výsledky z pozitívnych vzoriek teliat (7 ks) a ošípaných (3 ks) jednoznačne ukazujú na skutočnosť, že extrakty zo vzoriek tkanív vykazujú evidentne väčšie inhibičné zóny ako pevné vzorky. Z použitých mikroorganizmov vykazoval väčšiu citlivosť *B. subtilis* ako *S. aureus*.

extrakty tkanív; mikrobiologická difúzna metóda

Podchytenie rezíduí inhibičných látok v organickom materiáli je okrem iných faktorov vo veľkej miere závislé od použitej diagnostickej metódy. Mnohé modifikácie už overených testov umožnili úzko špecifikovať niektoré metódy, a to buď so zameraním na vyšetrovaný materiál — jeho druh, alebo na hľadanie inhibičnej látky.

V súčasnosti používané diagnostické metódy za týmto účelom môžeme zaradiť do dvoch základných skupín, a to do skupiny fyzikálno-chemickej a skupiny mikrobiologickej.

Najväčšie uplatnenie v praxi nachádzajú mikrobiologické metódy, pretože sú dokonale rozpracované a ich rôzne modifikácie a variácie s neobmedzeným množstvom použitia mikrobiálnych kmeňov zaručujú ich spoľahlivosť a rozšírenosť; v súčasnosti u nás v pomerne dobre vybavených laboratóriách nemožno hovoriť o ich náročnosti. Sú to metódy vhodné k detekcii takmer všetkých antibiotík používaných vo veterinárnej praxi. Spoľahlivo ich možno použiť pri vyšetrovaní vzoriek rôzneho druhu (orgány, tkanivá) a charakteru konzistencie (pevné, tekuté).

Stále aktuálne sú diagnostické metódy pre stanovovanie inhibičných látok zo vzoriek mäsa a orgánov jatkových zvierat.

U hovädzieho dobytku orientovali svoje práce týmto smerom Retzlaff a Djalili-Afchar (1974), Kučera a Šimková (1976), Takács a i. (1976), ktorí hľadali prevádzkovo nenáročné

a použiteľné spôsoby pre ich uplatnenie. Nouws a Ziv (1977) tieto metódy rozširujú aj na stanovenie inhibičných látok v krvi, v moči a v obličkách.

U teliat dosiahli pozoruhodnejšie výsledky v overovaní metód detekcie Mc Cracken a O'Brien (1976a, b), Sonennschein a i. (1976), Schmidt (1976) a iní.

Podobný efekt ako v mäse hovädzieho dobytku a teliat možno očakávať aj v mäse ošipáných. Určitú špecifičnosť pre tento druh zvierat pri detekcii sledujeme u Fouda a Lyncha (1978), Schmidta a Cremmlinga (1975) a Berga (1976). Berg (1976) dokumentuje spoľahlivé výsledky výlučne z obličiek ošipáných.

Vysoký záujem o detekčné metódy inhibičných látok v mlieku vnáša enormnú snahu hygienických pracovníkov overovať a vyberať najvhodnejšie metódy pre prax. Na túto oblasť potravinárskych surovín a výrobkov zameriavajú svoju činnosť Konečný (1978), Rybińska (1978), Katz a Fassbender (1978), Gounelle a Thieulin (1979) a iní.

O niečo menej prác je orientovaných na zisťovanie mikrobiálne inhibičných látok v mäse hydiny (Smither, 1975; Quarles a i., 1975; Mulder a Hulst-Arkel, 1977; Rutzyńska-Skornieczna, 1977), vo vajciach (Schellhaas, 1974; Karkocha, 1979) a v mäse rýb (Mc Cracken a i., 1976; Malíková a i., 1978).

V našej práci sme mikrobiologickou difúznou metódou sledovali inhibičné látky v mäse a orgánoch nevyhnutne zabitých ošipáných a teliat. Výsledky získané z pevných vzoriek sme porovnávali s výsledkami získanými z extraktov tých istých orgánov za štandardných podmienok.

MATERIÁL A METÓDA

Inhibičné látky sme stanovovali vo vzorkách z pečene, srdca, obličiek a chrbtovej svaloviny nevyhnutne zabitých ošipáných a teliat. Vyšetrili sme vzorky z 30 ošipáných (t. j. 120 vzoriek) a z 16 teliat (64 vzoriek). Na detekciu sme použili bežne používanú mikrobiologickú difúznou metódu a dva zbierkové kmene zárodkov *S. aureus* CCM 2022 a *B. subtilis* CCM 1999. Zvolenou pôdou bol živný agar čs. proveniencie s pH upraveným na 7,2. Na Petriho misky o priemere 10 cm sme pipetovali 20 ccm agaru, do ktorého boli vopred po schladení na teplotu 45 až 50 °C odpipetované zárodky mikroorganizmov z bujónovej kultúry.

Pevné vzorky na vyšetrenie sme upravili tak, aby mali tvar kocky o hrane cca 1 cm, a na živnú pôdu sme ich ukládali tak, aby reznou plochou priľnuli na MPA.

Extrakty sme získavali homogenizáciou 10 g vzorky orgánu alebo mäsa s 20 ml pufru pH 7. Po dvojhodinovej extrakcii a desaťminútovej centrifugácii pri 4000 otáčkach za minútu bolo zo získaného supernatantu množstvo 0,2 ml použité k nánášaniu do korkovrtom vyrezaných jamiek v MPA o priemere 1 cm. Prítomnosť inhibičných látok vo vzorkách sa prejavovala tvorbou inhibičných zón, ktorých veľkosť sme odpočítavali v milimetroch. Inhibičné zóny pod 1 mm sme hodnotili ako stopy. Hodnotenie sme vykonávali po dvojhodinovej až trojhodinovej predifúzii pri laboratórnej teplote a v 18 až 20-hodinovej inkubácii v termostate s vytepmením na teplotu 38 °C.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tab. I dokumentované výsledky z pozitívnych vzoriek teliat jednoznačne poukazujú na skutočnosť, že extrakty získané zo vzoriek mäsa a orgánov vykazujú evidentne väčšie inhibičné zóny ako pevné vzorky.

Treba ďalej dodať, že inhibičné zóny boli v porovnaní so zónami z pevných vzoriek nielen väčšie, ale aj jasnejšie a miesto dislokácie bolo ostrejšie. Zaujímavé je, že v niektorých prípadoch, keď sme hodnotili výsledok z pevnej vzorky ako negatívny, vykazovali extrakty buď stopy, alebo sme dokonca mohli evidovať jasnú inhibičnú zónu (č. vz. 3).

I. Výsledky inhibičného testu v mm pozitívnych vzoriek z teliat — Results of an inhibition test in mm of positive samples in calves

Číslo vzorky	Druh vzorky	Používané kmene mikroorganizmov			
		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>	
		pevné vzorky	extrakty	pevné vzorky	extrakty
3	pečeň	neg.	neg.	neg.	stopy
	srdce	neg.	neg.	2	2
	oblička	neg.	neg.	neg.	2
	sval	neg.	neg.	stopy	stopy
4	pečeň	4	7	5	10
	srdce	3	4	4	8
	oblička	4	6	6	10
	sval	2	5	4	8
8	pečeň	neg.	neg.	stopy	stopy
	srdce	neg.	neg.	2	2
	oblička	neg.	neg.	stopy	stopy
	sval	neg.	neg.	neg.	neg.
9	pečeň	neg.	neg.	4	5
	srdce	neg.	neg.	neg.	neg.
	oblička	neg.	neg.	2	2
	sval	neg.	neg.	neg.	neg.
10	pečeň	neg.	neg.	1	1
	srdce	neg.	neg.	1	3
	oblička	neg.	neg.	2	3
	sval	neg.	neg.	neg.	neg.
13	pečeň	neg.	neg.	neg.	neg.
	srdce	neg.	neg.	stopy	neg.
	oblička	2	3	1	4
	sval	3	3	1	5
15	pečeň	neg.	neg.	3	4
	srdce	neg.	neg.	stopy	2
	oblička	neg.	neg.	3	5
	sval	neg.	neg.	neg.	neg.

II. Výsledky inhibičného testu v mm pozitívnych vzoriek z ošipaných — Results of an inhibition test in mm of positive samples in pigs

Číslo vzorky	Druh vzorky	Použité kmene mikroorganizmov			
		<i>S. aureus</i>		<i>B. subtilis</i>	
		pevné vzorky	extrakty	pevné vzorky	extrakty
5	pečeň	neg.	neg.	neg.	neg.
	srdce	neg.	neg.	stopy	1
	oblička	neg.	neg.	stopy	2
	sval	neg.	neg.	neg.	neg.
10	pečeň	neg.	neg.	3	3
	srdce	neg.	neg.	stopy	3
	oblička	neg.	neg.	3	3
	sval	neg.	neg.	neg.	neg.
14	pečeň	1	1	2	2
	srdce	2	4	4	5
	oblička	2	4	2	2
	sval	neg.	1	1	2

Výrazný rozdiel vo veľkosti inhibičných zón sme zaznamenali u oboch použitých kmeňov zárodkov, samozrejme do tej miery, pokiaľ bol mikroorganizmus citlivý na neznáme antibiotikum v tom-ktorom orgáne alebo tkanive. V tomto smere sa nám ukázal *B. subtilis* spoľahlivejší ako *S. aureus*. *S. aureus* iba v dvoch prípadoch reagoval pozitívne u vzoriek z teliat a v jednom prípade u vzoriek z ošipaných (tab. II). Niektoré pevné vzorky z tkanív a orgánov, ktoré sme hodnotili ako stopy, sme z extraktov tých istých tkanív mohli evidovať ako jasné a zreteľné zóny až 3 mm veľké.

Pri hľadaní vhodnej metodiky pre dôkaz inhibičných látok sa nám teda osvedčila mikrobiologická metóda, ktorá v našom prípade značne zvýraznila výsledky z tkanív a orgánov tým, že sme získavali a použili popri pevných vzorkách aj ich extrakty. Na tento fakt poukázali Pichnarčík a i. [1974], Siklenka a Pichnarčík [1975], ktorí danú problematiku získavania extraktov rozvíjajú z pevných vzoriek.

Značne zvýraznený efekt detekcie inhibičných zón s použitím extraktov tkvie zrejme v predpoklade zvýhodnenej difúzie inhibičnej látky do prostredia agaru. Tento názor majú aj Lengyel a Roško [1979], ktorí obdobnú metódu použili pri dôkaze inhibičných látok v mŕtvolkách včiel.

Poznáme metódy získavania extraktov z biologického materiálu s cieľom detekcie inhibičných látok. Sú to však výlučne fyzikálne alebo chemické metódy, ktoré sú značne náročné na prístrojové vybavenie laboratórií. Vyžadujú manipuláciu s relatívne čistými látkami [Konečný a Rucki, 1979]. Ich dĺžka času detekcie je závislá od voľby tej-ktorej metódy (chromatografická, oscilopolarografická, fotometric-

ká, titračná a iné). Metóda získavania extraktov z pevných vzoriek orgánov, nami navrhovaná a na našom pracovisku overená, tvorbu inhibičných zón časovo neovplyvní. Je jednoduchá, nenáročná a ľahko zvládateľná v procese prípravy vzoriek k testovaniu. Dá sa predpokladať, že aj nešpecifickosť mikrobiologických testov, ktorú uvádzajú napr. Honikel a Hambloch (1976) ako zápornú stránku týchto testov, možno čiastočne ovplyvniť. Práve použitím extraktov zo vzoriek mäsa a orgánov a porovnaním ich výsledkov s paralelnými vzorkami z pevných vzoriek s prihliadnutím na použitý testovací kmeň mikroorganizmov možno do určitej miery určiť druh použitej inhibičnej látky — antibiotika.

Literatúra

- BERG, H.: Beobachtungen und Anmerkungen zum Nachweis von mikrobiellen Hemmstoffen in den Schweinenieren. Schlacht u. Vermarkt., 76, 1976, s. 258-261.
- FOUDA, H. G. — LYNCH, M. J.: Determination of antibiotic residues of plauracin in swine tissues. J. agric. fd Chem., 26, 1978, s. 463-465.
- GOUNELLE de FONTANEL, H. — THIEULIN, G.: Sur la présence d'antibiotiques dans le lait de consommation. Aliment et Vie, 67, 1979, s. 112-113.
- KARKOCHA, I.: Wykrywanie pozostałości chloramfenikolu w jajach. Roczn. Państw. Zakł. Hig., 30, 1979, s. 43-45.
- KATZ, S. E. — FASSBENDER, C. A.: Improved microbiological assay for penicillin residues in milk and dairy products. J. Assoc. off. analyt. Chem., 61, 1978, s. 918-922.
- KONEČNÝ, S.: Problematika výskytu reziduí antibiotik ve vejcích. Hyd. Priem., XVIII, 1976, s. 106-110.
- KONEČNÝ, S. — RUCKI, J.: K detekci antibiotik ve tkáních poražených zvířat. Veterinářství, XXIX, 1979, s. 317-319.
- KUČERA, P. — ŠIMKOVÁ, E.: Perspektivy vyšetřování orgánů a masa poražených zvířat na obsah antibiotik. Veter. Med. (Praha), 21, 1976, s. 127-134.
- LENGYEL, G. — ROŠKO, R.: Použitie difúznej mikrobiologickej metódy na dôkaz antibiotík ako inhibičných látok v mŕtvoľkách včiel. In: Zbor. ŠVS MPVž SSR, 6, 1979, s. 127-132.
- MALÍKOVÁ, M. — HABRDA, J. — MATYÁŠ, Z.: Vyšetření tržních kaprů na rezidua antimikrobiálních látek. Veter. Med. (Praha), 23, 1978, s. 549-553.
- MCCRACKEN, A. — O'BRIEN, J.: Detection of antibiotic residues in calf tissues. Res. veter. Sci., 21, 1976a, s. 240-241.
- MCCRACKEN, A. — O'BRIEN, J.: Comparison of two methods for detecting antibiotic residues in slaughter animals. Res. veter. Sci., 21, 1976b, s. 361-363.
- MCCRACKEN, A. — FIDGEON, S. — O'BRIEN, J. — et al.: An investigation of antibiotic and drug residues in fish. J. appl. Bact., 40, 1976, s. 61-66.
- MULDER, R. W. — HULST-ARKE, M. C.: Rückstände von Antibiotika in Muskulatur und Organen von Schlachtgeflügel. Arch. Lebensm.-Hyg., 28, 1977, s. 17-20.
- NOUWS, J. F. M. — ZIV, G.: Distribution und Rückstände von Tetracyklinen in den Geweben normal geschlachteter und notgeschlachteter Wiederkäuer. Schlacht u. Vermarkt., 77, 1977, s. 220-225.
- PICHNARČÍK, J. — SIKLENKA, P. — ŠTEFUNKA, F.: Výskyt inhibičných látok v mäse a orgánoch klinicky zdravých jatočne odporázaných ošipaných, hovädzieho dobytku, kurčiat a moriek. Veter. Čas., XVI, 1974, s. 41-47.
- QUARLES, C. L. — FAGERBERG, D. J. — RANSON, J. A. — WILLIAMS, L. P.: Chick model for evaluating antibiotics. Poult. Sci., 54, 1975, s. 1807.
- RUTCZYŃSKA-SKONIECZNA, E. M.: Wykrywanie pozostałości erytromycyny v mieste drobiu. Roczn. Państw. Zakł. Hig., 28, 1977, s. 571-576.
- RYBIŃSKA, K.: Wykrywanie pozostałości streptomycyny w mleku. Roczn. Państw. Zakł. Hig., 29, 1978, s. 287-290.
- RETZLAFF, N. — DJALILI-AFCHAR, A.: Zur Problematik der Entnahme von Proben zur Rückstandsuntersuchung bei Schlachttieren. Schlacht u. Viehhof-Ztg., 74, 1974, s. 298-300.

SCHELIHAAS, G.: Untersuchungen zur Frage Hemmstoffnachweises bei Hühner-eiern. Food Sci. Technol. Abstr., 6, 1974, s. 175.

SCHMIDT, U.: Rückstände in Schlachtierkörpern von Kälbern nach nutritiver Verabreichung von Virginiamycin. Lohman Inf., 23, 1976, s. 15.

SCHMIDT, U. — CREMMLING, K.: Untersuchungen über unspezifische Reaktionen im Hemmstofftest beim Antibiotika-Nachweise in Schweinenieren. Fleischwirtschaft, 55, 1975, s. 1736-1737.

SIKLENKA, P. — PICHNARČÍK, J.: Výskyt inhibičných látok v mäse a orgánoch hospodárskych zvierat odporázaných v prevádzke sanitného bitúnku. Veterinárství, XXV, 1975, s. 517-518.

SMITHER, R.: Evaluation of two simple assay methods for detecting antibiotic residues in chicken and pig muscle. J. appl. Bact., 38, 1975, s. 235-243.

SONNENSCHNEIN, B. — BISPING, W. — HAZEM, A. S. — CONRAD, P.: Versuche zur Ermittlung von Wirkstoffrückständen in essbaren Geweben, Blutserum und Urin von Kalb, Rind und Schwein nach Applikation verschiedener Antibiotika bzw. Chemotherapeutika. Dtsch. tierärztl. Wschr., 82, 1976, s. 54-60.

TAKÁCS, J. — SIMONFFY, Z. — HORVÁTHNE, J. E.: Biológiaiag aktív maradványanyagok vizsgálata a húsból és a húskészítményekben. Magy. állatorv. Lap., 31, 1976, s. 211-216.

Došlo dňa 24. 6. 1981

СИКЛЕНКА, П. — ПЛЕВА, Я. — БАРАНОВА, М. — МАЛЯ, П. — ПОЛИАКОВА, А. (Институт экспериментальной ветеринарии, Кошице): Методика экстрактов в определении остаточного действия ингибирующих веществ в тканях вынужденно убитых свиней у телят. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 105-110.

Нами изучались различия в определении остаточного действия ингибирующих веществ в образцах тканей вынужденно убитых свиней и телят. Обследовались образцы печени, сердца, почки и мышцы от 30 свиней и 16 гол. телят. Для определения брались твердые части тканей органов, наносимые на агарную среду, а экстракты из твердых частиц вкладывались в ямки агарной среды. Пробы параллельно обрабатывались микробиологическим диффузионным методом с применением микроорганизмов *S. aureus* CCM 2022 и *B. subtilis* CCM 1999. Метод получения экстрактов из твердых проб органов был нами предложен и проверен в нашем институте. Наличие ингибирующих веществ проявлялось образованием ингибирующих зон. Результаты из положительных проб телят (7 гол.) и свиней (3 гол.) однозначно свидетельствуют о факте, что экстракты из проб тканей образуют более явные ингибирующие зоны, чем твердые пробы. Из использованных микроорганизмов более чувствительным оказался *B. subtilis* по сравнению с *S. aureus*.

определение остаточного действия; ингибирующие вещества; экстракты тканей; микробиологический диффузионный метод

SIKLENKA, P. — PLEVA, J. — BARANOVÁ, M. — MALA, P. — POLIAKOVÁ, A. (Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice): A Method of Obtaining Extracts for the Detection of Residues of Inhibitory Substances in Tissues of Pigs and Calves after Emergency Slaughter. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 105-110.

Differences were studied in detecting residues of inhibitory substances in tissue samples of pigs and calves after emergency slaughter. Samples of liver, heart, kidney and muscle of 30 pigs and 16 calves were examined. Solid samples of organ tissues placed on an agar medium and extracts of the solid samples placed into agar pits were used for detection. Samples were parallelly subjected to the microbiologic diffusion method, using the *S. aureus* CCM 2022 and *B. subtilis* CCM 1999 microorganisms. The method of obtaining the extracts from solid samples of the organs was proposed and tested at our own workplace. The presence of inhibitory substances was displayed by the formation of inhibition zones. Results of the positive samples in calves (7 samples) and in pigs (3 samples) point out explicitly to the fact that the extracts of the tissue samples display positively larger inhibition zones in comparison with the solid samples. *B. subtilis* was demonstrated to be more sensitive than *S. aureus*, comparing the used microorganisms.

detection of residues; inhibitory substances; tissue extracts; microbiologic diffusion method

Adresa autorov:

MVDr. Pavol Siklenka, CSc., prof. MVDr. Ján Pleva, CSc., prom. chem. Mária Baranová, MVDr. Pavel Maľa, MVDr. Anna Poliaková, Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Dukelských hrdinov 1, 040 00 Košice

STANOVENÍ ZEARALENONU V ZRNINÁCH VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ

L. Helán, V. Kahle, K. Tesařík

HELÁN, L. — KAHLE, V. — TESAŘÍK, K. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Ústav analytické chemie ČSAV, Brno): *Stanovení zearalenonu v zrninách vysokoučinnou kapalinovou chromatografií*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 111-117.

U zrnin — kukuřice, pšenice a ječmene — jsme stanovili zearalenon kapalinovou chromatografií za použití přístroje československé výroby. Metoda dovozuje stanovit tento mykotoxin až do koncentrace 8 μg na kilogram zrniny.

mykotoxiny; genitotoxin; HPLC — high (pressure) performance liquid chromatography

Mykotoxin zearalenon (F-2) je produkován převážně plísněmi *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* a dalšími. Závažnost negativních vlivů tohoto metabolitu (estrogenní účinky) na základní užitkové vlastnosti vysokoprodukčních zvířat, jako je plodnost, vývin pohlavních orgánů, jejich činnost i počet narozených mláďat, vedla četné autory k tomu, aby vypracovali vhodné metody pro stanovení zearalenonu v krmivu s následnou identifikací a vyloučením kontaminovaných krmiv určených pro výživu těchto zvířat.

Z hlediska hygienického je pak závažná problematika vzniku reziduí v potravinách živočišného původu, zejména v mléce.

Zvýšený zájem o stanovení tohoto metabolitu se objevil v souvislosti s neplodností dojníc v USA v roce 1967. Neplodnost byla přisuzována zkrmovanému senu, které obsahovalo zearalenon (Mirocha aj., 1968a). Ve svých dalších studiích došli Mirocha aj. (1968b, 1969) k závěru, že tento metabolit, produkováný plísní *Fusarium graminearum* u kukuřice, souvisí i s neplodností prasnic. Zearalenon vyvolává estrogenní syndrom — edematózní zvětšení vulvy a mléčných žláz, v těžších případech výhřez rekta nebo vagíny a zvětšení dělohy, dále pak pseudobřezost, snížení početnosti vrhů až o 55 % s projevy defektů končetin u narozených selat. Krmné zkoušky u březích prasnic vykazovaly stejné klinické symptomy jako případy zjištěné v terénu (Miller aj., 1973). Zearalenon se může metabolizovat a ve formě zearalenolu přejít do mléka kojících prasnic.

Schweighardt aj. (1978), Möller a Josefsson (1978), Malaiyandi a Barrette (1978), Kallala a Saastamoinen (1979), Josefsson a Möller (1979), Beck aj. (1979), Cohen a Lapointe (1980), Shannon aj. (1980), Shotwell aj. (1980) popisují postupy stanovení zearalenonu, skládající se

vždy z přípravy vzorku a z vlastního chromatografického stanovení. Přípravě vzorku je věnována obvykle velká pozornost, zaměřená na dva základní kroky — extrakci a čištění — které se skládají vždy z několika samostatných operací.

Vzorek se rozměluje a homogenizuje v etylacetátu, v chloroformu, éteru nebo v metanolu. Kapalina se odfiltruje a zearalenon extrahuje roztokem hydroxidu sodného, který se neutralizuje kyselinou fosforečnou nebo chlorovodíkovou na pH 6 až 8. Z tohoto prostředí je zearalenon extrahován chloroformem, zahuštěn a v této formě dávkován do chromatografu.

V jiných pracích se používá čištění přes kolonu s florisilovou nebo silikagelovou náplní, eluát se zahustí odpařením a teprve tento koncentrát se nastříkuje na chromatografickou kolonu.

Ve většině zveřejněných prací je použito vysokoúčinné kapalinové chromatografie jako separační metody vhodné pro oddělení a kvantitativní stanovení zearalenonu, sporadicky se užívá chromatografie na tenké vrstvě, popřípadě plynové chromatografie. V posledním případě je nutné zearalenon derivatizovat především na trimetylsilyléter.

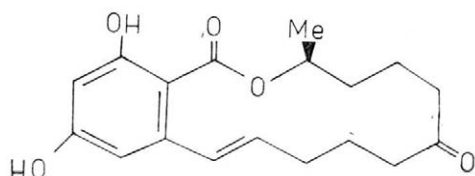
Jak vyplývá z publikovaných prací i z vlastností stanovovaného zearalenonu, je kapalinová chromatografie zatím jedinou metodou, která umožňuje stanovit tuto látku s dostatečnou citlivostí a přesností bez předchozí derivatizace. Protože domácí výroba (k. p. Laboratorní přístroje) dodává přístroje potřebné kvality, bylo hlavním záměrem této práce ověřit možné využití domácí techniky a nalézt nejmenší stanovitelné koncentrace zearalenonu při použití domácích přístrojů.

MATERIÁL A METODA

Zearalenon $C_{18}H_{22}O_5$ (obr. 1) je bílá krystalická látka, mol. hmotnost 318 s bodem tání 164°C až 165°C a s absorpčním maximem 236 nm, 274 nm a 316 nm. Vyznačuje modrozelenou fluorescencí při působení dlouhovlnného (360 nm) UV světla a intenzivnější zelenou fluorescencí při působení krátkovlnného (260 nm) UV světla. Teplota (12 až 14°C) během růstu plísně je důležitá pro vysokou produkci toxinu. Čistá látka, použitá dále jako standard, byla získána od fy Senn Chemicals Dielsdorf, Švýcarsko. Organická rozpouštědla — etylacetát, propylalkohol, metanol, chloroform — byla dodána n. p. Lachema v čistotě p. a.

EXTRAKCE

Abychom se maximálně přiblížili skutečným podmínkám, přidali jsme k 20 g jemně pomletého a dobře zhomogenizovaného vzorku známé množství standardu zearalenonu (tab. I). Takto upravený vzorek byl mísen se 150 ml etylacetátu po dobu 15 minut magnetickým míchadlem, aby homogenizace byla dokonalejší. Po důkladném rozptýlení standardu byl roztok odpařen do sucha. Pak jsme přistoupili k vlastní extrakci.



1. Strukturní vzorec zearalenonu — Structural formula of zearalenone

Číslo analýzy	Přídavek zearalenonu na 20 g zrniny μg	Množství zearalenonu v nástřiku 5 μl ng	Výška píku mm
1	0,2	12,5 ^a	12
2	0,4	25,0 ^a	21
3	1,0	62,5 ^a	33
4	2,0	125,0 ^a	73
5	3,0	187,5 ^a	115
6	4,0	250,0 ^a	149
7	2,0	125	72 ^b
8	2,0	125	62 ^b
9	2,0	125	76 ^b
10	2,0	125	73 ^b
11	—	50	28
12	—	50	29

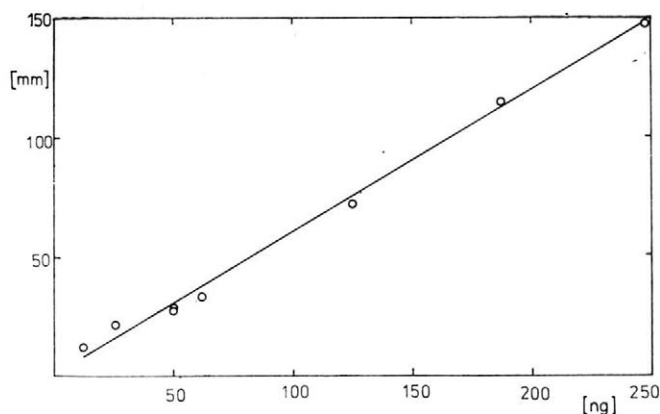
^a = za předpokladu 100% výtěžnosti extrakce

^b = průměr dvou měření

Ze známých extrakčních postupů jsme vycházeli z práce, kterou uveřejnili Schweighardt aj. (1978).

Z 20 g vzorku bylo reziduum extrahováno 200 ml etylacetátu po dobu 30 minut mícháním magnetickým míchadlem. Po 30 minutách byl roztok ponechán tři minuty v klidu, aby se usadily pevné částice a urychlila filtrace. Roztok byl zfiltrován přes filtrační papír (Schleicher & Schüll) a filtrát odpařen v 250 ml baňce na vakuovém odpařovači. Získaný odparek byl kvantitativně přenesen pomocí chloroformu (2 + 2 + 1 ml) do centrifugační zkumavky. V ní byl extrakt smísen s 2 ml roztoku hydroxidu sodného [roztok c (NaOH) = 1 mol.l⁻¹ vody] a intenzivním třepáním emulgován s chloroformovou fází. Urychleného oddělení fází bylo dosaženo odstředěním při 10 000 l.min.⁻¹ po dobu čtyř minut. Alkalická fáze byla odsáta a postup byl opakován. Alkalické fáze byly spojeny v 10 ml zkumavce a po předběžném přidání 1 ml roztoku kyseliny fosforečné [roztok c (1/3 H₃PO₄) = 2 mol.l⁻¹ vody] a jedné kapky fenolftaleinu byl roztok titrován roztokem kyseliny fosforečné [roztok c (1/3 H₃PO₄) = 2 mol.l⁻¹ vody] do úplného odbarvení. Z roztoku bylo reziduum vyextrahováno třepáním v kónické zkumavce s 1 ml chloroformu opakovaně dvakrát. Po oddělení byly chloroformové fáze odsáty a po následném spojení byly odpařeny na vodní lázni v proudě dusíku při teplotě 45 °C. Takto připravený vzorek byl rozpuštěn v 80 μl propylalkoholu a vzorky o objemu 5 μl byly dávkovány na chromatografickou kolonu.

Kapalinový chromatograf použitý pro separaci zearalenonu byl sestaven z jednotlivých dílů československé výroby. Mobilní fáze (směs metanolu s vodou 70 : 30) byla tlačena přes kolonu pumpou VCM 300 (Vývojové dílny ČSAV, Praha). K tlumení pulsů sloužil hydraulický RC člen, sestavený ze dvou manometrů (Prema, n. p., Stará Turá) a z hydraulického odporu — nerezové kapiláry. Nerezová kolona o rozměrech 150 X 4 mm byla vyrobena v dílnách (Ústav analytické chemie ČSAV, Brno). Kolona byla plněna sorbentem Silasorb C₁₈ (Lachema, n. p., Brno) o zrnění 7,5 μm viskozitní metodou (Kahle a Tesařík, 1980). K fotometrické detekci zearalenonu byl použit UV detektor LCD 254 (Laboratorní přístroje, k. p., Praha), pracující při vlnové délce 254 nm. Chromatogramy byly zaznamenány zapisovačem TZ 21S (Laboratorní přístroje, k. p., Praha). Vzorky byly dávkovány na kolonu přes silikonové septum mikrodávkovacím MD 30 (Dioptra Turnov) v objemech 5 μl .

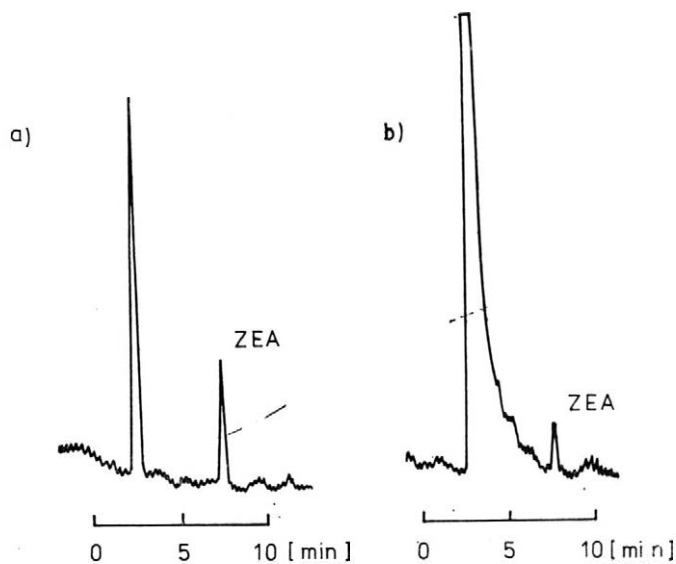


2. Závislost výšky píku na množství přidavku zearalenonu do vzorku kukuřice — The relationship of the peak height on zearalenone addition into the maize sample

VÝSLEDKY A DISKUSE

Použitý extrakční postup jsme ověřovali na vzorcích ječmene, pšenice a kukuřice. Na základě předběžných výsledků extrakčních a čistících postupů jsme k podrobnému ověření celé metodiky vybrali kukuřici. Ve srovnání s ostatními studovanými zrninami naráží extrakční postup u kukuřice na největší potíže vzhledem k vysokému obsahu tukových látek.

Podle postupu popsaného v metodické části jsme k vzorkům kukuřice přidali standard zearalenonu (tab. I) a provedli jsme extrakci. Získané extrakty jsme nastříkovali na chromatografickou kolonu a měřili jsme výšku píků zearalenonu. Výsledky stanovení jsou uvedeny v tab. I. Graficky je závislost výšky píku na množství mykotoxinu znázorněna na obr. 2.

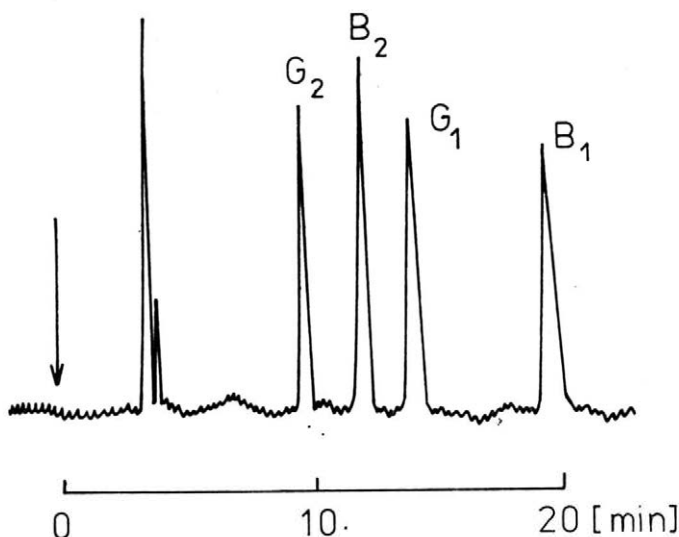


3. Dělení zearalenonu: a) nástřik 5 μ l standardního roztoku zearalenonu (50 ng), b) nejnížší detekovatelné množství zearalenonu po extrakci z 20 g kukuřice — Zearalenone separation: a) sample of 5 μ l of standard zearalenone solution (50 ng), b) the lowest detectable zearalenone amount after extraction from 20 g of maize

Pracovní podmínky: kolona 150 $\times$ 4 mm, sorbent Silasorb C18 o zrnění 7,5 μ m, mobilní fáze metanol : voda (70 : 30), průtok 1 ml $\cdot$ min⁻¹, tlak 5,6 MPa, UV detektor LCD 254 1/8, zapisovač TZ 21S 2 mV, posuv 0,3 cm $\cdot$ min⁻¹, doba trvání analýzy 7,5 min.

4. Dělení aflatoxinů B₁, B₂, G₁, G₂ — Separation of B₁, B₂, G₁, G₂ aflatoxins

Pracovní podmínky stejné jako u obr. 3, pouze mobilní fáze metanol : voda (40 : 60)



Ke stanovení výtěžnosti extrakčního postupu byl na kolonu nastříkán standardní roztok zearalenonu (tab. I). Typický příklad dělení je patrný z obr. 3a. S přihlédnutím k velikosti šumu, který umožňuje měřit výšku pík pouze s omezenou přesností, lze říci, že výtěžek extrakce je téměř stoprocentní (obr. 2).

Chromatogram (obr. 3b) ukazuje odezvu detektoru při nástřiku 12,5 ng zearalenonu. Stanovíme-li jako požadavek pro nejnížší detekovatelné množství výšku píku trojnásobnou proti výšce šumu, lze za uvedených podmínek spolehlivě detekovat ještě 10 ng zearalenonu v jednom nástřiku — 5 μ l, což odpovídá koncentraci zearalenonu ve vzorku zrniny 8 μ g . kg⁻¹.

Úpravou extrakčního postupu, zvětšením nástřikovaného množství a další optimalizací separačních podmínek je možné dosáhnout ještě vyšší citlivosti.

Reprodukovatelnost extrakce byla ověřena opakovaným nástřikem 125 ng zearalenonu na chromatografickou kolonu (analýza čís. 7 až 10 v tab. I). Těmto výsledkům odpovídá relativní směrodatná odchylka $\pm$ 8,6 %. Vzhledem k tomu, že se extrakční proces skládá z několika operací, které nutně vedou k zvýšenému rozptylu konečných výsledků, je vypočítaná relativní směrodatná odchylka velmi dobře přijatelná. Běžně uváděná hodnota relativní směrodatné odchylky pro stanovení na kapalinovém chromatografu činí $\pm$ 2 až 3 %. Pečlivé dodržení jednotlivých operací v extrakčním postupu bude tedy mít rozhodující vliv na přesnost získaných výsledků. Na tomtéž zařízení a téže koloně lze za použití příslušné mobilní fáze separovat skupinu aflatoxinů (G₂, B₂, G₁, B₁) (obr. 4).

ZÁVĚR

Ověřovací experimenty prokázaly, že je možné stanovit obsah zearalenonu v zrninách na stavebnicovém kapalinovém chromatografu československé výroby. Stejný přístroj dovoluje stanovit i další mykotoxiny, jak ukazuje záznam dělení čtyř aflatoxinů. Nejmenší detekovatelné

množství za popsaných podmínek bylo $8 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ zrnin se směrodatnou odchylkou = 8,6 %.

Vzhledem k tomu, že negativní podíl zearalenonu na výsledných estrogeních účincích není v našich chovech vysokoprodukčních zvířat dosud ověřován, umožňuje popsaný model upřesnit stanovení diagnózy v případě poruch reprodukce prasat a skotu, spojených s výskytem mykotoxikóz. Rovněž pořizovací náklady použitých přístrojů jsou v ekonomické oblasti velice dobře přijatelné vzhledem k několikanásobně vyšším cenám zahraničních dodavatelů vyrábějících příslušná zařízení.

Literatura

BECK, W. — FANKEL von, R. — BLUTSCH, I.: Eine rasche, quantitative Bestimmungsmethode für Zearalenon in Maissilagen und anderen Futtermitteln. Landwirtsch. Forsch., 32, 1979, s. 250-254.

COHEN, H. — LAPOINTE, M. R.: Sephadex LH-20 cleanup, high pressure liquid chromatographic assay, and fluorescence detection of zearalenone in animal feeds. J. Assoc. off. analyt. Chem., 63, 1980, s. 642-646.

JOSEFSSON, E. — MÖLLER, T. E.: High pressure liquid chromatographic determination of ochratoxin A and zearalenone in cereals. J. Assoc. off. analyt. Chem., 62, 1979, s. 1165-1168.

KAHLE, V. — TESAŘÍK, K.: Jednoduché zařízení k plnění kolon pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Chem. Listy, 74, 1980, s. 874-877.

KALLELA, K. — SAASTMOINEN, I.: A simple method of determining zearalenone in cereals by liquid chromatography. Eur. J. appl. Microbiol. Biotechnol., 8, 1979, s. 135-138.

MALAIYANDI, M. — BARRETTE, J. P.: A high pressure liquid chromatographic method for the quantitation of sub-microgram amounts of zearalenone (F-2) in agricultural products. J. environ. Sci. Health, B, 13, 1978, s. 381-400.

MILLER, J. K. — HACKING, A. — HARRISON, J. — GROSS, V. J.: Stillbirths, neonatal mortality and small litters in pigs associated with the ingestion of *Fusarium* toxin to pregnant sows. Veter. Rec., 93, 1973, s. 555.

MIROCHA, C. J. — HARRISON, J. — NICHOLIS, A. A. — McCLINTOCK, M.: Detection of a fungal oestrogen (F-2) in hay associated with infertility in dairy cattle. Appl. Microbiol., 16, 1968a, s. 797.

MIROCHA, C. J. — CHRISTENSEN, C. M. — NELSON, G. H.: Physiologic activity of some fungal estrogens produced by *Fusarium*. Canc. Res., 28, 1968b, s. 2319.

MIROCHA, C. J. — CHRISTENSEN, C. M. — NELSON, G. H.: Biosynthesis of the fungal estrogen F-2 and a naturally occurring derivative (F-3) by *Fusarium moniliforme*. Appl. Microbiol., 17, 1969, s. 482.

MÖLLER, T. E. — JOSEFSSON, E.: High pressure liquid chromatography of zearalenone in cereals. J. Assoc. off. analyt. Chem., 61, 1978, s. 789-792.

SHANNON, G. M. — SHOTWELL, O. L. — LYONS, A. J. — WHITE, D. G. — GARCIA-AGUIRRE, G.: Laboratory screening for zearalenone formation in corn hybrids and inbreds. J. Assoc. off. analyt. Chem., 63, 1980, s. 1275-1277.

SHOTWELL, O. L. — BENNETT, G. A. — GOULDEN, M. L. — PLATTNER, R. D. — HESSELTINE, C. W.: Survey for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin in U. S. grain sorghum from 1975 and 1976 crops. J. Assoc. off. analyt. Chem., 63, 1980, s. 922-926.

SCHWEIGHARDT von, H. — BÖHM, J. — LEIBETSEDER, J.: Zearalenonbestimmung in Getreide mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futterm.-Kde, 41, 1978, s. 39-47.

Došlo dne 2. 8. 1982

ГЕЛАН, Л. — КАГЛЕ, В. — ТЕСАРЖИК, К. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно; Институт аналитической химии ЧСАН, Брно): **Определение зеараленона в зерновых высокоскоростной жидкой хроматографией.** Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 111-117.

У зерновых — кукурузы, пшеницы и ячменя — определяли зеараленон путем жидкой хроматографии с использованием прибора чехословацкого производства. Метод позволяет определить этот микотоксин вплоть до концентрации 8 мкг на кг зерна с точностью превосходящей $\pm 9\%$.

микотоксины; генитоксин; HPLC — high (pressure) performance liquid chromatography

HELÁN, L. — KAHLE, V. — TESAŘÍK, K. (Veterinary Research Institute, Brno; Institute of Analytical Chemistry, Czechoslovak Academy of Sciences, Brno): *The Determination of Zearalenone in Cereals by means of Highly Performance Liquid Chromatography.* Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 111-117.

The determination of zearalenone content in cereals (maize, wheat and barley) was performed by means of liquid chromatography using the Czechoslovak-made apparatus. This method enables to determine this mycotoxin up to the concentration of 8 μg per 1 kg of grain with the accuracy exceeding $\pm 9\%$.

mycotoxins; genitotoxin; HPLC — high (pressure) performance liquid chromatography

Adresy autorů:

Ing. Lubor Helán, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

RNDr. Vladislav Kahle, RNDr. Karel Tesařík, Ústav analytické chemie ČSAV, Leninova 82, 611 42 Brno

Výběr z přírůstků

Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTIZ

z úseku veterinární medicína

Uvedené publikace je možné si vypůjčit osobně nebo písemně v ÚZLK, výpůjční oddělení, 120 56 Praha 2, Slezská 7. Výpůjční doba: pondělí až pátek od 9 do 18 hodin. U každé žádané publikace uveďte signaturu.

SINOWATZ, F.

D 59.577/32

Ultrastrukturelle und enzymhistochemische Untersuchungen am Ductus epididymidis des Rindes.

Berlin, Verlag Paul Parey 1981. 99 s., 73 obr., res. něm., angl. Fortschritte der Veterinärmedizin 32. (Nadvarlata — býci — enzymy — výzkum — metody — NSR)

DOECKE, F.

D 72.935

Veterinärmedizinische Endokrinologie.

Jena, Gustav Fischer Verlag 1981. 844 s., tab., obr. (Veterinární endokrinologie — sborník / Žlázy s vnitřní sekrecí — hospodářská zvířata — nemoci — sborník — NDR)

SCHOLE, J. — HARISCH, G. — SALLMANN, H.-P.

D 63.847

Belastung, Ernährung und Resistenz. Stress, Nutrition and Resistance.

Hamburg, P. Parey 1978. 85 s., 28 obr., 38 tab. Fortschritte in der Tierphys. u. Tierernähr. 9. (Laboratorní zvířata — látková přeměna — endokrinní — stres — vliv — výzkum — NSR)

BOISEN, S.

D 64.607/522

Mineralstofomsætning og syre-base balance hos voksende kaniner fodret med natriumhydroxidbehandlet halm. Souhrn dán., angl.

København, Landhusholdningsselskabets forlag 1982. 46 s., obr., tab. Beretning fra Statens husdyrbrugsforsøg 522. (Látková přeměna — minerální látky — králík — krmení — sláma — úprava — hydroxid sodný — vliv — výzkum — Dánsko)

ZEENNY, R.

D 38.168/1981/57

Quelques aspects de la sémiologie enzymatique appliqués à l'ostéite chez le cheval. Thèse présentée devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Toulouse, École nat. vétérinaire 1981. 78 s., obr., tab. (Osteoarthritis — kůň — výzkum — Francie — disertační práce)

VLIV RŮZNÝCH BUNĚČNÝCH KONCENTRACÍ A DOBY INKUBACE VARLETNÍ TKÁNĚ NA SYNTÉZU TESTOSTERONU

M. I. Mamode, L. Hanáková, Z. Věžník, K. Hruška

MAMODE, M. I. — HANÁKOVÁ, L. — VĚŽNÍK, Z. — HRUŠKA, K. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Vliv různých buněčných koncentrací a doby inkubace varletní tkáně na syntézu testosteronu*. Veter. Med. (Praha), 28, 1983 (2) : 119-125.

Buňky myších varlat byly enzymaticky uvolněny a v jednotlivých fázích štěpení a po promývání naštěpené tkáně bylo zjišťováno množství Leydigových buněk; toto množství se pohybovalo od 2 do 9 %. Nejvíce Leydigových buněk (9 %) jsme získali při promývání separovaných tubulů. Zkoušeli jsme odpověď buněčných suspenzí v sedmi různých koncentracích na stimulaci lidským choriovým gonadotropinem (HCG). Jako vyhovující se ukázaly koncentrace buněčných suspenzí od $5,3 \cdot 10^5$ do $1,4 \cdot 10^6$ buněk ml^{-1} . Po dvou až třech hodinách inkubace byly naměřené hodnoty testosteronu spolehlivé pro zjištění aktivity gonadotropních preparátů.

biologický pokus *in vitro*; Leydigovy buňky; gonadotropní hormony; steroidogeneze

Při zjišťování aktivity gonadotropních hormonů biologickým pokusem *in vitro* stoupá v závislosti na době inkubace produkce testosteronu celými krysími varlaty (Dufau aj., 1972; Dufau a Catt, 1975), suspenzí varletních buněk krys a myší (Dufau a Catt, 1975; Yu aj., 1981) a izolovanými Leydigovými buňkami (Janszen aj., 1976; Grotjan aj., 1978).

Produkce testosteronu krysími varlaty bez stimulace byla sledována v hodinových intervalech po dobu šesti hodin (Dufau aj., 1971) a čtyř hodin (Dufau aj., 1972). Dufau a Catt (1975) zjišťovali v hodinových intervalech množství testosteronu produkovaného buňkami krysích varlat při stimulaci gonadotropinem po dobu tří hodin. Suspenzi izolovaných Leydigových buněk krys použili Janszen aj. (1976) a měřili produkci bazální i produkci po přidání gonadotropinu po 20, 40 a 180 minutách inkubace, van Beurden aj. (1976) zjišťovali bazální produkci v půlhodinových intervalech po dobu dvou hodin a Grotjan aj. (1978) stimulovanou produkci v půlhodinových intervalech po dobu tří hodin.

V předchozí práci jsme sledovali syntézu testosteronu dekapsulovanými varlaty, fragmenty varlat a suspenzí buněk varlat, která byla pro průkaz aktivity LH nejvhodnější, protože k její přípravě byl potřeba nejmenší počet zvířat a odpovědi triplicátů byly vyrovnané (Mamode aj., 1982).

V této práci jsme si vytkli za cíl zjistit množství Leydigových buněk v buněčné suspenzi připravené pro biologický pokus *in vitro*, ověřit optimální koncentraci buněčné suspenze a vhodnou dobu inkubace.

MATERIÁL A METODY

Dospělí myši samci ve věku dva až tři a půl měsíce byli usmrceni éterem a jejich varlata byla ihned přenesena do média M-199 (ÚSOL Praha) o pH 7,2 s 2 % bovinního séra.

Pro zjištění množství Leydigových buněk v suspenzi jsme inkubovali deset dekapsulovaných varlat za stálého třepání při teplotě 34 °C ve 4 ml média s 0,062 % kolagenázou (ÚSOL Praha). Třikrát po pěti minutách jsme médium odsáli a varlata jsme inkubovali pokračně v čerstvém médiu s kolagenázou (buněčná suspenze 1 až 3). Potom jsme naštěpenou tkáň promývali ve 20 ml média bez kolagenázy a médium rovněž odsáli (buněčná suspenze 4). Nakonec byla tkáň v 50 ml média bez kolagenázy protřepávána pět minut na vibrační třepačce a zfiltrována přes čtyři vrstvy hydrofilního gázu (buněčná suspenze 5). Médium obsahující uvolněné buňky jsme odštěďovali v chlazené odstředivce deset minut při 140 G a sedimenty jsme resuspendovali v médiu. Koncentrace buněčných suspenzí jsme stanovili hemocytometricky a z každé suspenze jsme udělali nátěr, z něhož byl po nabarvení metodou May-Grünwald-Giemsa stanoven buněčný diferenciál zhodnocením 400 buněk. Buněčné suspenze 1 až 5 jsme smíchali (buněčná suspenze 6), udělali jsme nátěr a stanovili koncentraci buněk. Zjišťovali jsme zastoupení Leydigových buněk, spermií a buněk vývojové spermatogenetické řady. Leydigovy buňky byly určovány podle velikosti, tvaru, excentrického uložení jádra, drsného jaderného chromatinu, přítomnosti jadérek a eozinofilní cytoplazmy obsahující lipidová granula nebo vakuoly.

Abychom ověřili optimální koncentraci buněčné suspenze na inkubaci, zkoušeli jsme sedm buněčných koncentrací. Buňky byly inkubovány s HCG (Praedyn Spofa) o aktivitě 0,6 až 16,6 m. j. na litr v triplikátech a u kontrolních vzorků bez HCG za stálého třepání ve vodní lázni při teplotě 34 °C po dobu tří hodin v prostředí s 95 % kyslíku a 5 % kyslíčniku uhličitého. Inkubované buněčné suspenze obsahovaly $1,2 \cdot 10^5$ až $1,4 \cdot 10^6$ buněk v 1 ml. Po inkubaci byly buněčné suspenze odštěďovány v chlazené odstředivce po dobu 20 minut při 1600 G. Supernatant jsme odsáli a v něm jsme stanovili koncentraci testosteronu radioimunoanalýzou (M a m o d e a j., 1982).

Ke zjištění vhodné doby inkubace jsme varlata *in toto* a fragmenty inkubovali s HCG v koncentracích 16,6 a 50 m. j. na litr, buněčné suspenze obsahující $1 \cdot 10^6$ buněk v 1 ml s HCG v koncentraci 50 m. j. na litr a kontrolní vzorky jsme inkubovali bez HCG. Inkubace byly provedeny za stálého třepání ve vodní lázni při teplotě 34 °C v prostředí s 95 % kyslíku a 5 % kyslíčniku uhličitého. Produkce testosteronu v supernatantu získaném odstředěním vzorků odebíraných v půlhodinových intervalech do tří hodin inkubace a u buněčné suspenze do čtyř hodin inkubace byla stanovena radioimunoanalýzou. Produkce testosteronu u celých varlat a fragmentů byla přepočítána na 100 mg tkáně.

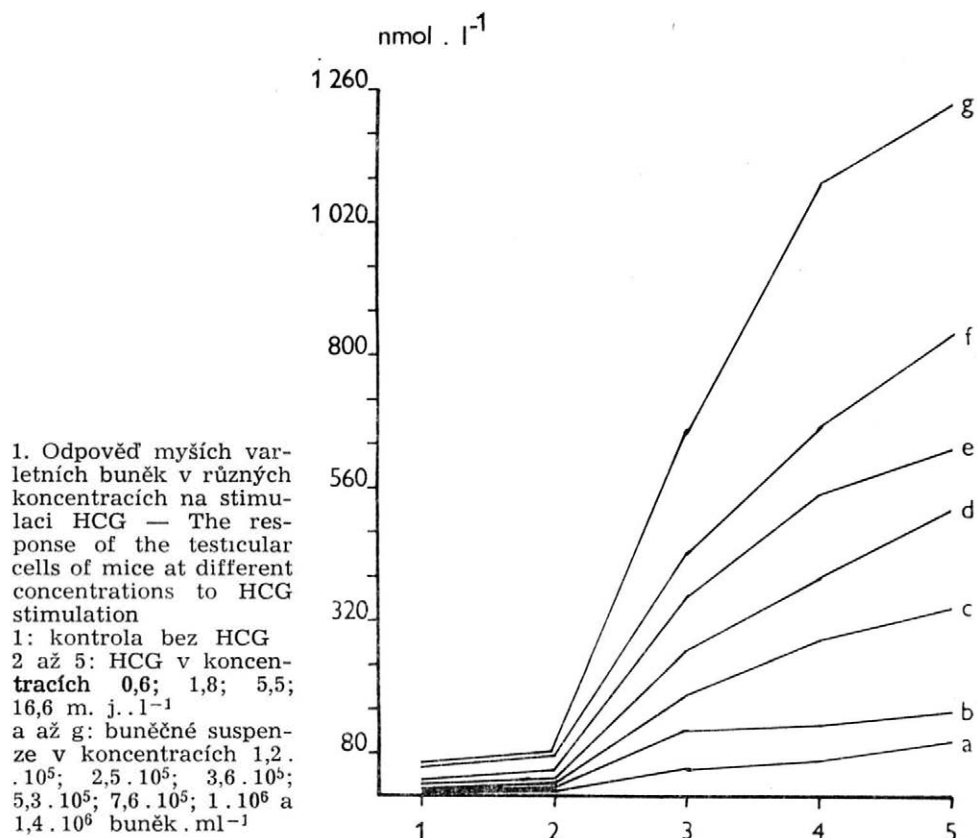
VÝSLEDKY

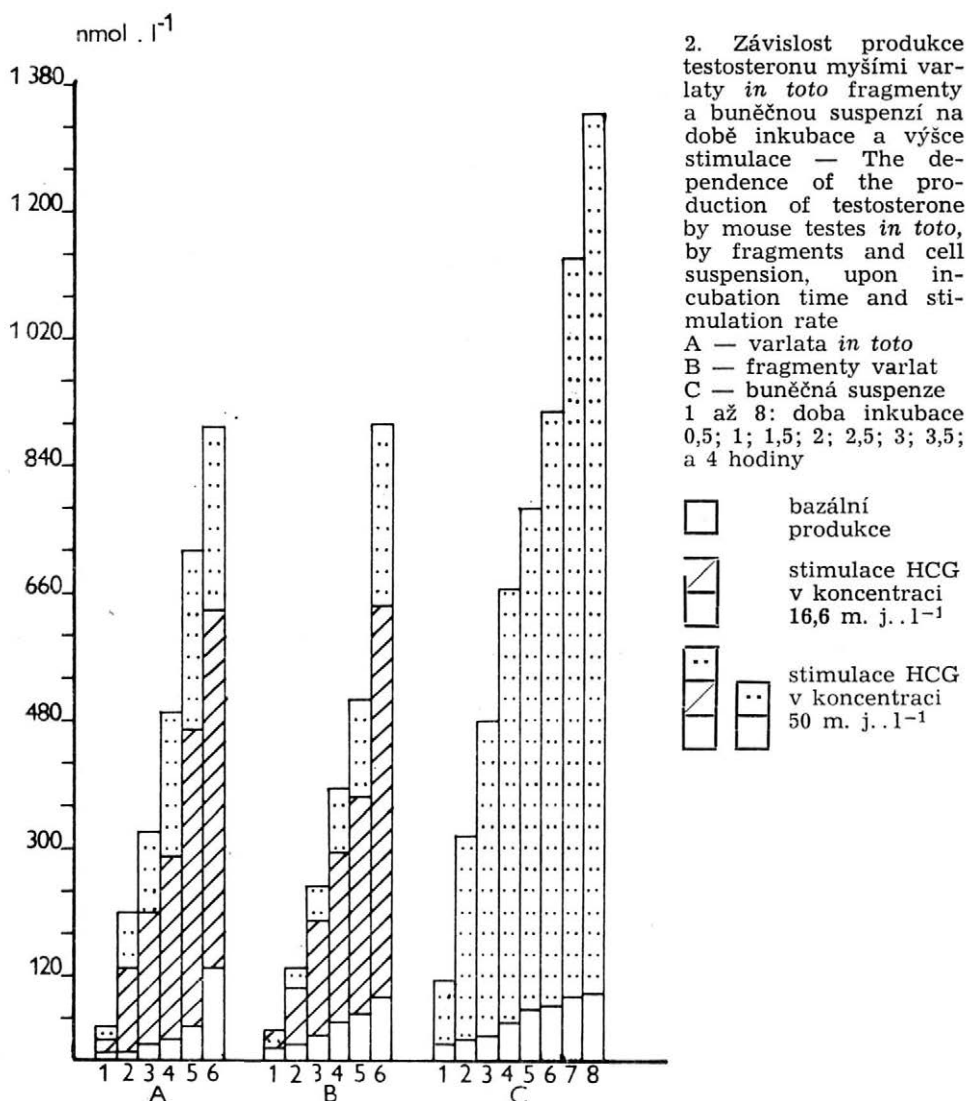
Po prvních pěti minutách štěpení jsme v buněčné suspenzi 1 zjistili krvinky, detritus, spermie a $39 \cdot 10^4$ buněk. Po dalších pěti minutách štěpení se částečně oddělily kanálky a v buněčné suspenzi 2 byly krvinky, spermie a $11 \cdot 10^5$ buněk. Po třetím pětiminutovém štěpení se separovaly kanálky téměř úplně a v buněčné suspenzi 3 byly krvinky, spermie a $31 \cdot 10^5$ buněk. Při protřepání se kanálky úplně oddělily a po jejich promytí v médiu bylo v buněčné suspenzi 4 získáno $14 \cdot 10^6$ buněk. V buněčné suspenzi 5 jsme zjistili $85 \cdot 10^6$ buněk. Celkové množství buněk získaných z deseti varlat bylo $103 \cdot 10^6$. Z nátěrů jednotlivých buněčných suspenzí

Buněčná suspenze	1	2	3	4	5	6
Leydigovy buňky	2	2	5	9	5	4
Buňky spermatogenetické řady	93	94	90	87	89	90
Spermie	5	4	5	4	6	6

jsme vyhodnotili procento Leydigových buněk, buněk spermatogenetické řady a spermií (tab. I).

Produkce testosteronu při stimulaci choriovým gonadotropinem závisí na koncentraci buněk (obr. 1). Buněčné suspenze o koncentracích $1,2 \cdot 10^5$ a $2,5 \cdot 10^5$ buněk na ml, obsahující malý počet Leydigových buněk, byly sice citlivé na zvyšující se koncentraci HCG, ale přesto nebyly velké rozdíly v koncentraci testosteronu u jednotlivých stimulací. Koncentrace gonadotropinu 0,6 m. j. na litr nestačila ke stimulaci buněk na rozdíl od stimulace 1,8 m. j. na litr, při které se ukázaly větší rozdíly v produkci u jednotlivých buněčných koncentrací. Čím vyšší buněčné





koncentrace bylo použito, tím vyšší byla produkce testosteronu, protože buněčné suspenze o vyšší koncentraci obsahovaly větší počet Leydigových buněk. To se projevilo u všech stimulací.

Syntéza testosteronu varlaty *in toto*, fragmenty i buněčnou suspenzí závisela na době inkubace a na výšce stimulace (obr. 2). Čím delší byla doba inkubace a čím vyšší stimulace, tím vyšší byla koncentrace produkovaného testosteronu. Bazální produkce testosteronu stoupala v závislosti na čase a po třech hodinách inkubace dosahovala u fragmentů o 12 nmol . l⁻¹ více než u buněčné suspenze, jejíž produkce se za další půl hodiny zvýšila na 90 nmol . l⁻¹, a po čtyřech hodinách inkubace dosáhla 96 nmol . l⁻¹. Při stimulaci 16,6 m. j. na liter stoupala koncentrace testosteronu u varlat *in toto* i u fragmentů od půl hodiny do tří hodin, ale po jedné hodině a po dvou a půl hodinách měla varlata *in toto* o 30

a $96 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ vyšší produkci než fragmenty. Při stimulaci 50 m. j. na litr v intervalech od půl do dvou a půl hodiny byla produkce u buněčné suspenze vyšší než u varlat *in toto* a fragmentů, ale po třech hodinách inkubace se u všech pohybovala kolem $900 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Po čtyřech hodinách inkubace se produkce testosteronu u buněčné suspenze zvýšila na $1340 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

DISKUSE

Při enzymatickém štěpení se postupně uvolňují varleční buňky. Kolagenáza je s nimi v přímém kontaktu a může docházet k lytickému působení na buněčné membrány. Aby se zabránilo jejich porušení, byly uvolněné buňky po každých pěti minutách štěpení odsávány a bylo k nim přidáváno médium bez enzymu. Výsledky ukazují, že už po první fázi štěpení uvolnila kolagenáza jak krvinky, tak Leydigovy buňky a buňky spermatogenetické řady. Po dalším štěpení se zvýšilo množství uvolněných buněk i procentuální zastoupení Leydigových buněk, ale obsah spermií zůstal stejný. Při dalším štěpení proniká kolagenáza do hlubších vrstev tkáně, která se rozpadá, uvolňují se další intersticiální buňky a kanálky se ještě více uvolňují, neseparují se však úplně, ale zůstávají částečně pohromadě. Proto bylo použito manuálního protřepání, aby se kanálky oddělily. Jak ukazuje počet buněk ve výsledcích, získá se nejvíce intersticiálních buněk a dalších složek při promývání. Přestože byly kanálky zcela uvolněny, bylo po třepání na vibrační třepačce získáno dalších 5 % Leydigových buněk, a tak se ukázalo, že promývání nestačí k tomu, aby se uvolnily všechny Leydigovy buňky. V naší práci obsahovala buněčná suspenze použitá k inkubaci 4 % Leydigových buněk v souladu s Lichtenbergem aj. (1982), kteří jich v suspenzích varlečních buněk získali 2 až 4 %.

Buňky o koncentracích $1,2 \cdot 10^5$ a $2,5 \cdot 10^5$ na ml nebyly schopny významně zvyšovat odpověď na vzestupné stimulační. Produkce sice stoupala, ale jen velmi mírně, protože množství Leydigových buněk v těchto suspenzích na výraznější produkci nestačilo. Naproti tomu u ostatních koncentrací značně stoupala produkce testosteronu při zvyšujících se stimulacích, a proto je možné těchto koncentrací používat při stanovování aktivity biopreparátů.

Inkubace lze dělat ve větším nebo menším objemu. Janszen aj. (1976) použili ke stimulaci suspenze izolovaných Leydigových buněk krys o obsahu $6 \cdot 10^5$ až $9 \cdot 10^5$ v objemu 0,2 až 0,3 ml, Sharpe a McNeilly (1980) $1 \cdot 10^6$ varlečních buněk krys v 0,2 ml média a dostali lineární produkci testosteronu. V naší práci ukázaly lineární odpověď na stimulaci HCG suspenze myších varlečních buněk o koncentracích $5,3 \cdot 10^5$ až $1,4 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, inkubované v celkovém objemu 4 ml u každého vzorku. Abychom snížili počet zvířat použitých v pokusu, používáme v současné době k inkubaci menší objem s koncentrací $1 \cdot 10^6$ buněk na mililitr.

Produkce testosteronu varlaty *in toto*, fragmenty i buněčnou suspenzí se s dobou inkubace zvyšuje. Bazální produkce celými varlaty a suspenzí varlečních buněk stoupala po dobu tří hodin v souladu s výsledky autorů Dufau aj. (1971, 1972), Bartke aj. (1976), Janszen aj. (1976) a van Beurden aj. (1976). Dufau aj. (1971) pro-

kázali vzestupnou produkci testosteronu celými varlaty až do šesti hodin inkubace. U buněčné suspenze v naší práci se udržuje schopnost syntézy po dobu čtyř hodin inkubace.

Při stimulaci varlat *in toto* a fragmentů HCG o koncentraci 16,6 m. j. na liter stoupá produkce testosteronu v závislosti na době inkubace. Při stimulaci 50 m. j. na liter syntetizují varlata *in toto*, fragmenty i buňky zvýšené množství testosteronu. V každém sledovaném časovém úseku je stimulovaná varleční tkáň i suspenze varlečních buněk schopna zvyšovat produkci testosteronu (Dufau aj., 1972; Dufau a Catt, 1975; Janszen aj., 1976; Grotjan aj., 1978). Stimulovaná buněčná suspenze začíná produkovat testosteron už po půl hodině, produkce se stále zvyšuje do čtyř hodin inkubace a neprojevuje se vyčerpání substrátu.

Literatura

BARTKE, A. — KUPFER, D. — DALTERIO, S.: Prostaglandins inhibit testosterone secretion by mouse testis *in vitro*. Steroids, 28, 1976, s. 81-88.

DUFAU, M. L. — CATT, K. J.: Gonadotropic stimulation of interstitial cell functions of the rat testis *in vitro*. Meth. Enzymol., 39, 1975, s. 252-271.

DUFAU, M. L. — CATT, K. J. — TSURUHARA, T.: Gonadotropin stimulation of testosterone production by the rat testis *in vitro*. Biochim. biophys. Acta, 252, 1971, s. 574-579.

DUFAU, M. L. — CATT, K. J. — TSURUHARA, T.: A sensitive gonadotropin responsive system: Radioimmunoassay of testosterone production by the rat testis *in vitro*. Endocrinology, 90, 1972, s. 1032-1040.

GROTJAN, H. E. — HEINDEL, J. J. — STEINBERGER, E.: Prostaglandin inhibition of testosterone production induced by LH, dibutyryl cyclic AMP or 3-isobutyl-1-methylxanthine in dispersed rat testicular interstitial cells. Steroids, 32, 1978, s. 307-321.

JANSZEN, F. H. A. — COOKE, B. A. — VAN DRIEL, M. J. A. — VAN DER MOLEN, H. J.: Purification and characterization of Leydig cells from rat testis. J. Endocrinol., 70, 1976, s. 345-359.

LICHTENBERG, V. — PAHNKE, V. G. — GRAESSLIN, D. — BETTENDORF, G.: Biological and immunological potencies of lutropin (LH) in human serum: Comparative studies using different standard preparations. Hormone Metab. Res., 14, 1982, s. 39-45.

MAMODE, M. I. — HANÁKOVÁ, L. — VĚŽNÍK, Z. — HRUŠKA, K.: Stanovení gonadotropní aktivity biopreparátu podle syntézy testosteronu myšími varlaty *in vitro*. Veter. Med. (Praha), 27, 1982, s. 371-377.

SHARPE, R. M. — McNEILLY, A. S.: Differences between dispersed Leydig cells and intact testes in their sensitivity to gonadotrophin stimulation *in vitro* after alteration of LH receptor numbers. Molec. cell Endocrin., 18, 1980, s. 75-86.

VAN BEURDEN, W. M. O. — ROODNAT, B. — DE JONG, F. H. — MULDER, E. — VAN DER MOLEN, H. J.: Hormonal regulation of LH stimulation of testosterone production in isolated Leydig cells of immature rats: The effect of hypophysectomy, FSH, and estradiol-17 β . Steroids, 28, 1976, s. 847-866.

YU, J. Y. L. — CHANG, T. Y. — HSU, H. K. — LIAO, C. F. — WAN, W. C. M.: Androgen/testosterone synthesis by the dissociated testicular cells from mice of different ages in response to rat LH stimulation *in vitro*. Bull. Inst., Zool., 20, 1981, s. 57-65.

Došlo dne 25. 10. 1982

МАМОДЕ, М. И. — ГАНАКОВА, Л. — ВЕЖНИК, З. — ГРУШКА, К. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Влияние разных клеточных концентраций и срока инкубации семенниковой ткани на синтез тестостерона. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983 (2) : 119-125.

Энзиматически освобожденные клетки мышиных семенников по отдельным фазам расщепляли, промывали расщепленную ткань и определяли количество Лейдиговых клеток: оно составляло от 2 до 9% (9% дает промывка отсепарированных тубулов). Реакцию клеточных суспензий испытывали в 7 концентрациях в ответ на стимулирование хориальным гонадотропином человека (HCG). Хорошо себя оправдывают концентрации суспензий в пределах $5,3 \cdot 10^5$ — $1,4 \cdot 10^6$ клеток. мл⁻¹. После 2—3 час. инкубации величины тестостерона оказались надежными для определения активности гонадотропных препаратов.

биологический опыт *in vitro*; клетки Лейдига; гонадотропные гормоны; стероидогенез

MAMODE, M. I. — HANÁKOVÁ, L. — VEŽNÍK, Z. — HRUŠKA, K. (Veterinary Research Institute, Brno): *The Effect of Different Cell Concentrations and Incubation Time of Testicular Tissue on Testosterone Synthesis*. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983 (2) : 119-125.

The cells of the testes of mice were enzymatically separated and the amount of Leydig cells was determined in different stages of dispersion and after washing the separated tissue. This amount ranged from 2 to 9%. The largest quantity of Leydig cells (9%) was obtained when separated tubuli were washed. The response of cell suspensions at seven concentrations stimulated by human chorion gonadotrophin (HCG) was tested. Cell suspension concentrations from $5,3 \cdot 10^5$ to $1,4 \cdot 10^6$ cells/ml were found to be satisfactory. After two to three hours of incubation, the values of testosterone could be used for the determination of the activity of gonadotropic preparations.

bioassay *in vitro*; Leydig cells; gonadotropic hormones; steroidogenesis

Adresa autorů:

MVDr. Mahomed Ismet Mamode, ing. Ludmila Hanáková, MVDr. Zdeněk Věžník, CSc., doc. MVDr. Karel Hruška, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 3 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny články :

- M. Baran, D. Jalč: Motorika bachora pri náhrade slamy pilinami a celulózou v kŕmnej dávke oviec
- L. Leng, M. Szányiová, K. Boďa, J. Várady, J. Feješ: Vylučovanie močoviny a elektrolytov obličkami baranov kŕmených bezdusíkovou syntetickou diétou
- V. Uhrín: Mikroskopická stavba epitelu vajcovodu kravy počas pohlavného cyklu
- V. Uhrín, J. Kliment: Submikroskopické zmeny ciliárnych buniek epitelu vajcovodu kravy počas pohlavného cyklu
- J. Říha, J. Minář, O. Králík, V. Krupa: Hospodářský význam ochrany tažných koní v lesních závodech před dvoukřídlým hmyzem sajícím krev
- R. Lahučký, K. Fischer, Ch. Augustini: Využitie biochemických a biofyzikálnych ukazovateľov svalu (*m. longissimus dorsi*) odobratého strelnou biopsiou k predpovedi kvality mäsa ošípaných
- J. Pleva, J. Baláž: Biologická hodnota bielkovín PSE mäsa
- J. Bartoš, Z. Matyáš: Průzkum přítomnosti sterigmato-cystinu v tuzemských zrninách

GRUNDRISS DER POPULATIONSLEHRE

NÁSTIN NAUKY O POPULACI

N. V. Timofeev-Ressovsky, A. V. Jablovskij, N. V. Glotov

Edice „Genetik, Grundlagen, Ergebnisse und Probleme in Einzeldarstellungen“, editor prof. dr. H. Stubbe, sv. 8. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1977, 266 s., 89 obr., 5 tab.

Kniha je překladem ruského originálu „Očerok učeniya o populacii“ (Moskva, Nauka 1973), který byl autory doplněn o některé citace, byly provedeny některé změny vyobrazení a malé změny textu.

Autoři přistupují k problematice z obecného biologického, zvláště genetického a evolučního hlediska. Uváděné příklady se týkají převážně volně žijících zoologických objektů a v daleko menší míře rostlin. Umožňují proto zajímavá srovnání, zejména s využitím genetiky populací v chovu hospodářských zvířat.

Po předmluvách a úvodní kapitole je zařazena kapitola o vztazích populací k biocenózám, biogeocenózám a biosféře, jejichž součástí tvoří. Podkapitoly ovšem začínají biosférou a končí populací, aby bylo možné upřesnit pojmy a vztahy vzhledem k zaměření knihy. Další kapitola o populacích se zabývá areálem druhu, rozdělením individuů v tomto areálu, definicí pojmu populace, populacemi a různými způsoby rozmnožování organismů. Uváděná definice má plnou platnost jen pro organismy rozmnožující se pohlavně, amfimikticky, s možností rekombinace chromozomů a genů (přesněji alel). Těm je v knize věnována hlavní pozornost. Dále je i s příklady uvedena dynamika populací v prostoru a čase, údaje o populacích v různých částech areálu druhu, o kontaktech a izolaci mezi populacemi, poměru mezi hranicemi populací a biogeocenóz a o poměru pohlaví a věkovém složení v populacích.

Další kapitoly jsou věnovány genetice a fenetice populací. Druhý pojem se v čs. literatuře obvykle nepoužívá. Autoři jej uvádějí pro výzkum populací druhů, u nichž jsou známy odchylné znaky a fenotypy, ale jejichž genetický výzkum je buď nemožný, nebo se zatím neuskutečnil. Vedle termínů fenetika a fén používají také genofond vedle genofond populace. Tyto pojmy jsou upřesněny ve dvou kapitolách se subkapitolami, z nichž jedna má název genetika populací a další fenetika populací. Známý termín fenogenetika však autoři nepoužívají.

Pojmu genofond populace lze ovšem použít i pro druhy, jejichž genetický výzkum vůbec neexistuje, jako je tomu u většiny volně žijících organismů. Tento genofond však samozřejmě existuje a vedle prostředí ovlivňuje základním způsobem fenotypový projev, i když o podrobnostech známých ve větším rozsahu u modelových objektů (jako je drozofila) mnoho nevíme. Ale právě srovnání populací druhů geneticky do značné míry prozkoumaných s druhy, u nichž známe vlastně jen fenotypové rozdíly a jejich změny, výskyt a kolísání a obrovské možnosti kombinací, ukazuje na platnost stejných obecných genetických zákonitostí. Uvádím tento názor, který také z celkového charakteru a zaměření knihy vyplývá, i když v ní není uveden, což by mohlo mást právě v souvislosti se snahou autorů upřesnit pojmy. Příklady o podrobněji prozkoumaných druzích, názorně v knize uvedené, a srovnání obou kapitol i dalšího obsahu názorně ukazují a ujasňují problematiku, kterou lze odvodit z teoretických úvah podložených poznatky obecné základní genetiky, pro niž se však obtížně shromažďují doložené konkrétní poznatky.

V kapitole o genetice populací jsou rozvedeny základní pojmy jako mendelovská populace, frekvence alel a genotypů s matematickým zdůvodněním; Hardy-Weibergův zákon, jemuž je věnována podkapitola, se uvádí jako základ moderní matematické genetiky populací, která však není dále v knize rozváděna modelováním procesů. Předmětem úvah jsou reálné přírodní populace, vždy rozdílné a různě ovlivňované, u nichž je představa panmixie pouze výchozím teoretickým hlediskem. Podkapitoly se dále zabývají genetickou heterogenitou populací, mutačním procesem a jeho významem, populačními vlnami, druhy izolace a přírodním výběrem; kapitola o fenetice populací údaje doplňuje a srovnává.

Poslední kapitola je věnována populacím ve vztahu k evoluci a systematice, srovnává hlediska genetická a evoluční, zdůrazňuje se v ní nutnost vycházet v systematice z fylogenetických vztahů, rozvádí se vztah mikroevoce a makroevoce. Kniha je zvláště zaměřena na problematiku mikroevoce jako na proces probíhající v populacích, který je ještě dostupný podrobnému zkoumání. Pozornost je věnována zejména druhu jako základnímu taxonu, který tvoří rozhodující etapu ve fylogenezi, dále vzniku druhu a nižších taxonů.

Uváděné příklady a vyobrazení o rozšiřování, rozdělování a změnách populací různých druhů se týkají vyšších obratlovců, včetně člověka, i obratlovců nižších i bezobratlých živočichů, zejména hmyzu (např. jednotlivých druhů drozofily), v menší míře některých kulturních rostlin (pšenice) a stromů (některých druhů dubu). Kniha ukazuje, jak se populace vždy navzájem liší, podobně jako jedinci, s výjimkou jednovaječných dvojčat. Dává plastickou představu o faktorech evoluce, z nichž aktivním, řídicím faktorem je přírodní selekce, která však zdaleka není tak jednoduchá a jednoznačná, jak se někdy uvádí. Jak autoři upozorňují, nemůže být kniha samozřejmě vyčerpávající, je však velmi podnětná. I obsáhlý seznam literatury může být jen výběrový. Předklad do němčiny je vysoce odborný a pečlivý.

Ing. Jiří Kučera, CSc.

OBSAH

Rob O., Klimeš V., Reichel F., Kohout L., Čep K.: Terapeutické použití syntetického Gn-RH-Dirigestranu při poruchách reprodukčního cyklu krav v chovech s nízkou plodností	65
Navrátil S., Forejtek P., Raszyk J., Štefan M., Dvořák M., Toullová M., Mrva V., Čanderle J.: Změny vybraných biochemických ukazatelů krevního séra u anestrických prasnic	73
Černík K.: Termostabilita vakcinačního kmene viru infekční burzitidy	81
Kyllar V., Dubská J., Neuhybel P.: Střevní anastomóza technikou invaginace bez sutury stěny u malých zvířat	89
Ingr I., Simeonová J.: Rychlé stanovení cholesterolu ve vaječném žloutku Bio-La-testem	97
Siklenka P., Pleva J., Baranová M., Maľa P., Poliaková A.: Metodika extraktov v detekcii reziduí inhibičných látok v tkanivách nevyhnute zabitých ošipaných a teliat	105
Helán L., Kahle V., Tesařík K.: Stanovení zearelenonu v zrninách vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	111
Mamode M. I., Hanáková L., Věžník Z., Hruška K.: Vliv různých buněčných koncentrací a doby inkubace varleční tkáně na syntézu testosteronu	119
Recenze	
Kučera J.: N. V. Timofeev-Ressovsky, A. V. Jablov, N. V. Glotov — Grundriss der Populationslehre	127

СОДЕРЖАНИЕ

Роб О., Климеš В., Рейхел Ф., Когоут Л., Чеп К.: Терапевтическое применение синтетического Gn-RH-Диригестрана при расстройствах полового цикла у коров в стадах с низкой плодовитостью	65
Навратил С., Форейтек П., Рашик Й., Штефан М., Дворжак М., Тоулова М., Мрва В., Чандерле Й.: Изменения некоторых биохимических показателей кровяной сыворотки у анестрических свинок	73
Черник К.: Термостабильность вакцинационного штамма вируса инфекционного бурсита	81
Кыллар В., Дубска Я., Нейгыбел П.: Кишечный анастомоз техникой инвагинации без шитья стенки у малых животных	89
Ингр И., Симеонова Я.: Быстрое определение холестерина в яичном желтке Био-Ла-Тестом	97
Сикленка П., Плева Я., Баранова М., Маля П., Полиакова А.: Методика экстрактов в определении остаточного действия игибирующих веществ в тканях вынужденно убитых свиней и телят	105
Гелан Л., Кагле В., Тесаржик К.: Определение зеараленона в зерновых высокоэффективной жидкой хроматографией	111
Мамоде М. И., Ганакова Л., Вежник З., Грушка К.: Влияние разных клеточных концентраций и срока инкубации семенниковой ткани на синтез тестостерона	119

Rob O., Klimeš V., Reichel P., Kohout L., Čep K.: Therapeutic Use of Synthetic Gn/RH-Dirigestrin in Cycle Disorders of Cows in Low-Fertility Herds	65
Navrátil S., Forejtek P., Raszyk J., Štefan M., Dvořák M., Toulová M., Mrva V., Čanderle J.: Changes in the Selected Biochemical Parameters of Blood Serum in Anoestrous Gilts	73
Černík K.: The Thermostability of the Vaccination Strain of Infectious Bursal Disease Virus	81
Kyllar V., Dubská J., Neuhybel P.: Intestinal Anastomosis by the Invagination Technique without Gut Wall Suture in Small Animals	89
Ingr I., Simeonová J.: Rapid Determination of Cholesterol in Egg Yolk by the Bio-La-Test	97
Siklenka P., Pleva J., Baranová M., Malá P., Poliaková A.: A Method of Obtaining Extracts for the Detection of Residues of Inhibitory Substances in Tissues of Pigs and Calves after Emergency Slaughter	105
Helán L., Kahle V., Tesařík K.: The Determination of Zearalenone in Cereals by means of Highly Performance Liquid Chromatography	111
Mamode M. I., Hanáková L., Věžník Z., Hruška K.: The Effect of Different Cell Concentrations and Incubation Time of Testicular Tissue on Testosterone Synthesis	119

Rukopisy odevzdány k tisku 5. 11. 1982 — Podepsáno k tisku 5. 1. 1983

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.