

Dita

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

7

ROČNÍK 34 (LXII)
PRAHA
ČERVENEC 1989
CENA 10 Kčs
CS ISSN 0590-5214

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

Rídí redakční rada: akademik Jaroslav Otto Vrtiak (předseda), akademik Koloman Boďa, prof. MVDr. Ján Elečko, CSc., ing. MVDr. Radomír Hromádka, prof. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., prof. MVDr. Dagmar Ježková, DrSc., doc. MVDr. Evžen Jurák, DrSc., MVDr. Jaroslav Palásek, CSc., prof. MVDr. Mikuláš Pješčak, CSc., doc. MVDr. Jozef Sokol, CSc., prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc.

Za vedení časopisu odpovídá akademik Jaroslav Otto Vrtiak

Redaktorka ing. Jovanka Václavičková

OBSAH

Granátová M., Pšikal I.: Buňkami zprostředkovaná imunita u telat imunizovaných nebo infikovaných virem infekční bovinní rhinotracheitidy	385
Brouček J., Gajdošík D., Kovalčík K., Brestenský V.: Zdravotný stav a metabolické ukazovatele u telat napájaných mledzivom a nezrelým mliekom konzervovaným sorbanom draselným a mliečnou krmnou zmesou	395
Lisák V., Vošta J., Řeháček J.: Výskyt <i>Coxiella burnetii</i> a <i>Chlamydia psittaci</i> u hovädzieho dobytku v južných Čechách	403
Míčková V., Lukášová J., Konečný S.: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> v syrovém a pasterovaném mléce	411
Ostrý V., Polster M.: Nález kyseliny cyklopiazonové a jejích producentů v požívatinách	421
Dvořák M., Láníková A., Kosková S., Diblíková I.: Fluorimetrické hodnocení aflatoxinogenity kmenů plísně <i>Aspergillus flavus</i> a <i>Aspergillus parasiticus</i> po kultivaci v tekutém médiu	431
Jakubička I., Barta M., Babušík P.: Fertilizační kapacita ejakulátu nutrií (<i>Myocastor coypus</i>) po extirpácii semenných vāčkov zistená testom penetrácie a prirodzeným párením	441

RECENZE

Vrtiak O. J.: Řeháček J., Tarasevičová I. V. — Acari-Borne Rickettsiae and Rickettsiones in Eurasia	447
---	-----

ŽIVOTNÍ JUBILEUM

Vrtiak O. J.: Životné jubileum akademika A. Ch. Sarkisova	448
---	-----

СОДЕРЖАНИЕ

Гранатова М., Пшикал И.: Посредничество иммунитета клетками у телят иммунизированных или инфицированных вирусом инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота	385
Броушек Я., Гайдошик Д., Ковалчик К., Брестенски В.: Состояние здоровья и метаболические показатели у телят питаемых молозивом и незрелым молоком, консервированным сорбентом калиевым и молочной кормовой смесью	395
Лисак В., Вошта Я., Ржегачек Й.: Наличие <i>Coxiella burnetii</i> и <i>Chlamydia psittaci</i> у крупного рогатого скота в южной Чехии	403
Мичкова В., Лукашова Й., Конечны С.: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в сыром и пастеризованном молоке	411
Остры В., Полстер М.: Открытие циклопиазоновой кислоты и ее продуцентов в пищевых продуктах	421
Дворжак М., Ланикова А., Коскова С., Дибликова И.: Флуориметрическая оценка афлатоксигениты штаммов плесени <i>Aspergillus flavus</i> и <i>Aspergillus parasiticus</i> после культивации в жидкой среде	431
Якубичка И., Барта М., Бабушик П.: Емкость фертильности эякулат нутрий (<i>Myocastor coypus</i>) после удаления семенных мешочков установленная путем тестирования проникания и природной случкой	441

BUŇKAMI ZPROSTŘEDKOVANÁ IMUNITA U TELAT IMUNIZOVANÝCH NEBO INFIKOVANÝCH VIREM INFEKČNÍ BOVINNÍ RHINOTRACHEITIDY

M. Granátová, I. Pšikal

GRANÁTOVÁ, M. — PŠIKAL, I. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Buňkami zprostředkovaná imunita u telat imunizovaných nebo infikovaných virem infekční bovinní rhinotracheitidy*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 385-394.

V předložené práci jsou popsány jednoduché a rychlé metody — inhibice adherence leukocytů — LAI a inhibice migrace leukocytů — LMI, pomocí kterých lze sledovat buňkami zprostředkovanou imunitu u zvířat. Společně se sérologickými a virologickými metodami byly oba testy použity ke sledování změn imunitního stavu telat po experimentální infekci virem IBR a po imunizaci inaktivovanou olejovou vakcínou proti IBR. Získané výsledky ukázaly, že dynamika změn v buňkami zprostředkované imunitě se po experimentální infekci a vakcinaci telat vyvíjela nezávisle na dynamice humorální reakce. Celková imunitní reakce zprostředkovaná buňkami nastupovala dříve u telat experimentálně infikovaných než u telat vakcinovaných. U některých vakcinovaných telat byl zjištěn modifikovaný průběh celulárních imunitních reakcí, který se kromě toho projevil i vylučováním viru IBR na sliznici nosní po čelení infekci. Testy LAI a LMI lze doporučit jak pro imunologické monitorování v klinické laboratoři, tak i pro výzkumné práce.

inhibice adherence leukocytů — LAI; inhibice migrace leukocytů — LMI; infekční bovinní rhinotracheitida — IBR; buňkami zprostředkovaná imunita

V posledních letech se intenzívně rozvíjí imunologie, která se uplatňuje nejen v humánní, ale i ve veterinární medicíně.

Reakce buňkami zprostředkované imunity jsou závislé na tzv. imunokomplementních buňkách, které mají schopnost na svých povrchových receptorech vázat antigen; vznikají tak buď imunologicky aktivované buňky, nebo buňky paměťové. Po opakované stimulaci paměťových buněk, které dlouhodobě přežívají, se T lymfocyty mění na efektorové buňky, pomocné buňky a supresorové buňky; z B lymfocytů vznikají buňky plazmatické.

Specificky stimulované T lymfocyty rozeznávají infikované cílové buňky a rozrušují je. Vylučují přitom účinné látky, lymfokiny, což je heterogenní populace molekul s různými biologickými vlastnostmi.

Reakce buňkami zprostředkované imunity mohou probíhat na různých typech buněk za přítomnosti protilátek, lymfokinů, nebo v kombinaci obou. Celý imunitní systém je nutno chápat jako velmi složitou souhru informací a funkcí jednotlivých typů buněk.

V naší práci byly pro studium specifické, buňkami zprostředkované imunity užity dvě metody *in vitro*:

1. Test inhibice adherence — LAI, jehož principem je zjištění, že leukocyty z jedince předem senzitivizovaného specifickým antigenem mají v jeho přítomnosti sníženou schopnost adherovat k podkladu ze skla nebo umělé hmoty (Thomson, 1979; Goldrosen aj., 1979).

2. Test inhibice migrace leukocytů — LMI je založen na tom, že leukocyty antigenem stimulovaného dárce po kokultivaci s týmž antigenem jsou inhibovány ve své migraci (Clausen, 1973; Field a Smith, 1984).

Uvedené metody byly užity u telat imunizovaných nebo experimentálně infikovaných virem IBR a u telat kontrolních.

MATERIÁL A METODA

ZVÍŘATA

Do pokusu bylo vybráno 24 telat ve věku tři měsíce, u kterých nebyly zjištěny virusneutralizačním testem (VNT) protilátky proti viru IBR. Telata byla po převozu rozdělena do tří skupin. První skupinu tvořilo 12 telat, která byla imunizována inaktivovanou adjuvantní vakcínou proti IBR; za 30 dnů po revakcinaci byla infikována virulentním kmenem IBR (kmen LA), aby mohl být sledován ochranný účinek vakcíny. Ve druhé skupině bylo sedm neimunizovaných telat, která byla experimentálně infikována virulentním kmenem IBR (kmen LA). Třetí skupinu tvořilo pět kontrolních telat, která nebyla v průběhu pokusu ani imunizována ani infikována.

IMUNIZACE TELAT

K imunizaci telat byla použita inaktivovaná adjuvantní vakcína proti IBR, připravená pomnožením vlastního izolovaného viru IBR (T/M-182) s obsahem $10^{5.5}$ TCID₅₀. 0,1 ml⁻¹. Vlastní vakcína byla — po inaktivaci viru formalínem — — připravena smícháním jednoho dílu virové suspenze se dvěma díly olejového adjuvans (Solvens, oper. č. 760885, Bioveta, Ivanovice na Hané) a byla aplikována v dávce 3 ml i. m. s revakcinací za 21 dní.

EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE TELAT

K členění infekci telat byl použit virulentní kmen viru IBR, kmen LA, ve třetí pasáži na buněčných kulturách telecích ledvin s titrem $10^{5.5}$ TCID₅₀. 0,1 ml⁻¹. Infekční inokulum bylo aplikováno v dávce 2×5 i. nas.

Po experimentální infekci byla všechna telata denně klinicky vyšetřena a po dobu 14 dnů byly pravidelně odebírány nosní sekrety k virologickému vyšetření. Každý čtvrtý nebo pátý den byly odebírány vzorky krve pro vyšetření imunologické a sérologické.

VIROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Množství viru IBR v odebraných nosních sekretech bylo stanoveno titrací na buněčných kulturách. Každé ředění vyšetřovaného vzorku (rozsah 10^{-1} až 10^{-8}) bylo inokulováno v objemu 0,1 ml vždy do čtyř zkumavek s narostlým monolayerem sekundárních telecích ledvin. Materiály, které po druhé pasáži na buněčných kulturách nevytvořily cytopatický efekt, byly považovány za negativní. TCID₅₀ pozitivních vzorků bylo stanoveno metodou, kterou uvedli Reed a Muench (1938).

Stanovení protilátek

Specifické protilátky proti IBR v sérech telat byly stanoveny modifikovanou nepřímou metodou ELISA v mikropovedení na polystyrénových deskách (KOH-

-I-NOOR, Dalečín) podle autorů Payment aj. (1980). V testu byl použit konjugát anti IgG SWAB/Px (n.p. ÚSOL, Praha) v pracovním ředění 1 : 2000. Jako substrát byla použita kyselina 5-aminosalicylová ve formě tablet (n.p. Bioveta, Ivanovice na Hané) s přidavkem 30 % peroxidu vodíku do konečné koncentrace 0,005 %.

Výsledné reakce byly odečítány na spektrofotometru Titertek, Multiskan při 492 nm vlnové délky proti roztoku substrátu.

Pro kvantitativní stanovení protilátek proti IBR byla využita matematická metoda, která umožňuje vypočítat titr ze dvou nebo čtyř ředění vyšetřovaných sér v porovnání s kompletní titrační křivkou pozitivního standardního séra (Štěpánek aj., 1983; Pšíkal aj., 1984). Výpočty byly prováděny na osobním počítači TI-51-III.

IMUNOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Separace leukocytů

Byla užita modifikovaná metoda podle Bendixena (Bendixen, 1977): 20 ml heparinizované krve (10 jednotek heparin Spofa na 1 ml krve) bylo smícháno se 40 ml redestilované vody; za 40 sekund byla izotonicita roztoku obnovena přidáním 10 ml 4,5% chloridu sodného. Suspenze byla odstředěna a pelet dvakrát promyt (900 ot. min⁻¹) v 0,85% chloridu sodném. Získané leukocyty potom byly naředěny na požadovanou koncentraci.

Test inhibice adherence leukocytů (LAI)

Metoda, kterou uvedli Goldgroten aj. (1979), byla modifikována takto: suspenze leukocytů byla naředěna médiem MEM (ÚSOL, Praha) s 2 % bovinního séra (Bioveta, Ivanovice na Hané) na $2 \cdot 10^4$ buněk $\cdot 1 \text{ ml}^{-1}$ a rozdělena do dvou zkumavek po 300 μl .

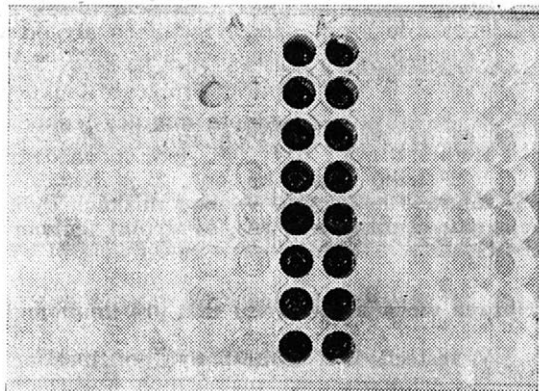
Do první zkumavky bylo přidáno 300 μl antigenu IBR vytitrovaného v testu LAI, do druhé, kontrolní zkumavky bylo dáno pouze 300 μl média. Po uzátkování a protřepání byly zkumavky inkubovány 15 minut při teplotě 37 °C, potom byly buněčné suspenze nakapány po 70 μl do dvou svislých řad polystyrénové desky (KOH-I-NOOR Hardmuth) a inkubovány 60 minut při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % oxidu uhličitého.

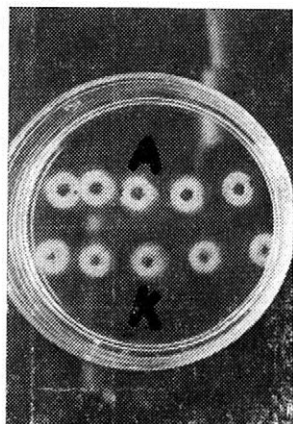
Potom byly desky opatrně propláchnuty fyziologickým roztokem a adherující buňky fixovány 10% roztokem formaldehydu po dobu deseti minut; pak byly barveny pět minut desetkrát ředěným Giemsovým roztokem.

Extinkce jednotlivých jamek mikroplotny byla měřena na spektrofotometru Multiskan s filtrem 490 nm. Z průměrných hodnot extinkcí jamek svislých řad byla vyjádřena inhibice adherence leukocytů v procentech podle vzorce:

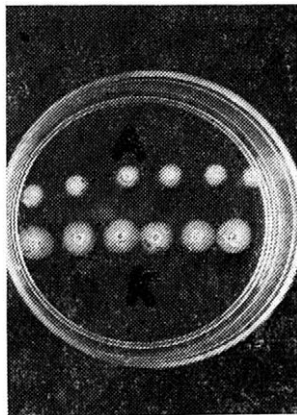
$$1 - \frac{\text{Ø hodnota extinkcí buněk s antigenem}}{\text{Ø hodnota extinkcí buněk bez antigenu}} \times 100$$

1. Mikrodeska s pozitivním testem LAI (65% inhibice). V pátém a šestém řádku byly kultivovány leukocyty s antigenem (A), v sedmém a osmém řádku byly kultivovány leukocyty bez antigenu (K) — A microplate with positive LAI test (65% inhibition). Leucocytes with antigen (A) were cultivated in the fifth and sixth rows, control leucocytes without antigen (K) were cultivated in the seventh and eighth rows





2. Petriho miska s negativním testem LMI — Petri dish with negative LMI test



3. Petriho miska s pozitivním testem LMI (55% inhibice) — Petri dish with positive LMI test (55% inhibition)

K obr. 2 a 3: V prvním řádku byly leukocyty inkubovány s antigenem (A), leukocyty bez antigenu jsou ve druhém řádku (K) — An explanatory note to Figs. 2 and 3: In the first row the leucocytes were incubated with antigen (A), in the second row there are control leucocytes without antigen (K)

Hodnota vyšší než 20 % byla považována za pozitivní výsledek. Na obr. 1 je na mikroplotné test LAI pozitivního vzorku s antigenem (řádek 5 a 6) a s médiem bez antigenu (řádek 7 a 8).

Test inhibice migrace leukocytů

Test LMI byl proveden podle Clausena (Clausen, 1971) jako přímý test pod agarem v této modifikaci: 1% agarové médium 45 °C teplé se rozplní po 8 ml na polystyrénové misky o průměru 6 cm. Po utužení se v médiu vykrojí dvě řady po pěti až šesti jamkách (průměr 2 mm) a vodní vývěvou se odstraní vykrojený agar.

50 μ l suspenze leukocytů (2.10⁸ buněk.ml⁻¹) v médiu MEM + 2 % séra bylo rozděleno do dvou zkumavek: do jedné se přidá 25 μ l média; po protřepání jsou suspenze přeneseny do jamek v agarovém médiu (pět jamek v první řadě je naplněno suspenzí leukocytů s antigenem, ve druhé řadě kontrolními leukocyty) (obr. 2 a 3). Potom byly misky inkubovány 18 až 20 hodin v atmosféře s 5 % oxidu uhličitého při teplotě 37 °C. Po této době je agarové médium převrstveno metanolem na 30 minut, potom 10% formaldehydem na 20 minut a agarové médium se odstraní. Po opláchnutí a usušení misek se mikroměřátkem mikroskopicky měří vzdálenost, do které leukocyty migrovaly od vnějšího obvodu jamky.

Procento inhibice migrace leukocytů se vypočítá podle vzorce:

$$1 - \frac{\text{hodnota migrace leukocytů s antigenem}}{\text{hodnota migrace leukocytů bez antigenu}} \times 100$$

Hodnoty vyšší než 20 % jsou považovány za pozitivní výsledek.

V Petriho misce na obr. 2 je test LMI negativní, na obr. 3 byla zjištěna 55% migrace leukocytů. V obou miskách byla v prvním řádku inhibována suspenze leukocytů s antigenem (A), kontrolní leukocyty bez antigenu jsou ve druhém řádku (K).

Příprava virového antigenu IBR pro imunologické testy

V testech LAI a LMI byl použit koncentrovaný virový antigen IBR. Virus IBR byl pomnožen na primárních kulturách telecích ledvin; suspenze sklizených

infikovaných buněk a volných virových partikulí byla vystavena ultrazvuku 180 W po dobu tří sekund. Po odstředění buněčného detritu při 3000 ot. min⁻¹ po dobu 20 minut byl supernatant znovu centrifugován při 60 000 × g po dobu 120 minut. Pelet byl resuspendován v médiu s 2 % prekolostálního telecího séra v množství odpovídajícím 1/100 původního objemu supernatantu. Takto zahuštěný antigen byl inaktivován 30 minut při teplotě 56 °C, rozplněn do ampulí a skladován při teplotě -60 °C.

VÝSLEDKY

ZDRAVOTNÍ STAV TELAT PO EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCI VIREM IBR

Všechna neimunizovaná telata po experimentální infekci virem IBR onemocněla. U telat byla již za 48 hodin po infekci (*p. i.*) naměřena zvýšená teplota $t = 40,8$ °C a během dalších šesti dnů neklesla u většiny zvířat pod 39,6 °C. Třetí den *p. i.* se u telat objevil buď výtok z nosních otvorů nebo z očí, dvě telata měla zrychlenou dechovou frekvenci. Příznaky respiračního onemocnění se stupňovaly a onemocnění vyvrcholilo šestý a desátý den *p. i.* Dvě telata musela být 14. den *p. i.* utracena.

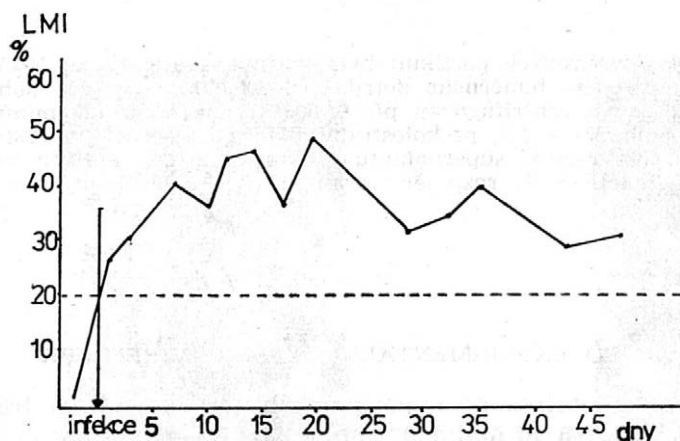
Vylučování infekčního viru IBR na nosní sliznici bylo prokázáno u všech neimunizovaných telat. Nejvyšší titr infekčního viru byl zjištěn nejčastěji třetí den *p. i.* (TCID₅₀ 10^{5,75} · 0,1 ml⁻¹) a vylučování viru pokračovalo dalších šest nebo deset dnů.

Intranazální infekce imunizovaných telat nebyla provázena výraznými klinickými příznaky onemocnění. Pouze u tří imunizovaných telat byly přechodně pozorovány klinické příznaky již za 48 hodin *p. i.* v podobě krátkodobě zvýšené tělesné teploty ($t = 39,8$ °C), neklidu, mírného sérozního výtoku z nosu. Za šest dnů *p. i.* se zdravotní stav těchto telat upravil na fyziologickou normu. K vylučování viru IBR na sliznici nosní došlo u tří imunizovaných telat již za 24 hodiny *p. i.*, ale v mnohem menších koncentracích (max. TCID₅₀ 10^{3,25} · 0,1 ml⁻¹) a podstatně kratší dobu (dva až tři dny) než u experimentálně infikovaných telat.

U zbývajících devíti imunizovaných telat nebyly po čelenžní infekci pozorovány klinické příznaky onemocnění a nebylo prokázáno vylučování viru na nosní sliznici.

4. Průměrné výsledky testu LAI u neimunizovaných telat po experimentální infekci virem IBR — Average results of LAI test in nonimmunized calves after experimental infection by IBR virus





5. Průměrné výsledky testu LMI u neimunizovaných telat experimentálně infikovaných virem IBR — Average results of LMI test in nonimmunized calves experimentally infected by IBR virus

VÝVOJ IMUNITNÍ ODPOVĚDI PO EXPERIMENTÁLNÍ INFEXCI TELAT

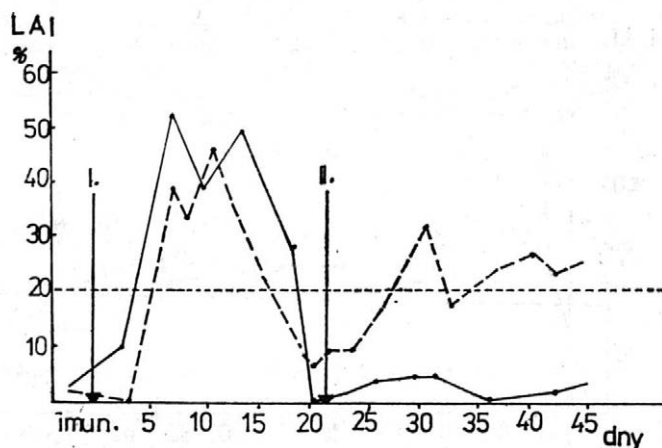
Na obr. 4 jsou uvedeny průměrné výsledky testu LAI u sedmi telat laboratorně infikovaných virem IBR. Schopnost leukocytů adherovat k podkladu se výrazně snížila již 48 hodin po infekci, maxima bylo dosaženo třetí až pátý den; pozitivní hodnoty byly měřeny až do 35. dne.

Průměrné hodnoty testu LMI u sedmi nevakcinovaných, virem IBR experimentálně infikovaných telat jsou znázorněny na obr. 5. Inhibice migrace leukocytů byla patrnější již třetí den po infekci a postupně se zvyšovala do 20. dne. Po této době byly zjištěny nižší hodnoty, ale po celou sledovanou dobu pozitivní.

Po experimentální infekci neimunizovaných telat byla první specifická sérologická reakce zaznamenána v testu ELISA u dvou telat 12. den *p. i.* a u zbývajících pěti telat 14. den *p. i.* v titrech 1 : 50 až 1 : 200.

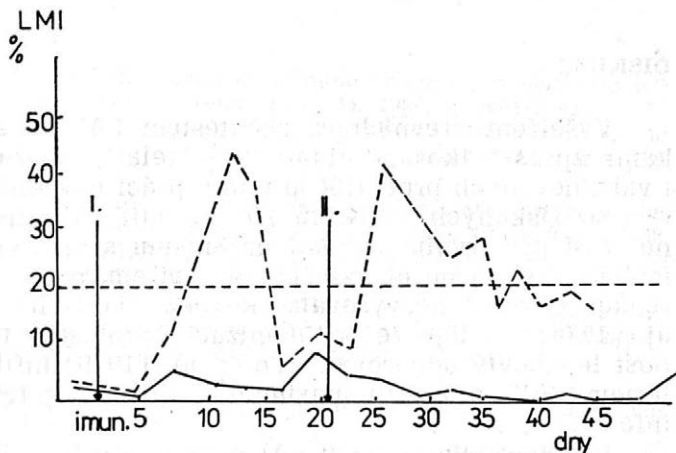
VÝVOJ IMUNITNÍ ODPOVĚDI PO IMUNIZACI TELAT

U devíti telat chráněných imunizací (po experimentální infekci zůstala zdravá) byly hodnoty v testu LAI nejvyšší šestý až dvanáctý den po imunizaci. Po revakcinaci (21. den) se adherence leukocytů opět snížila. U tří telat s nedostatečnou ochranou po imunizaci (po experimentální infekci onemocněla) byly v testu LAI nejvyšší hodnoty osmý až dva-



6. Průměrné výsledky testu LAI po účinné ---- a neúčinné ——— imunizaci telat proti viru IBR — Average results of LAI test after effective ---- and ineffective ——— immunization of calves against IBR virus

7. Průměrné výsledky testu LMI po účinné a neúčinné imunizaci telat proti viru IBR — Average results of LMI test after effective and ineffective immunization of calves against IBR virus



náctý den po imunizaci, potom se snížily na kontrolní hodnoty a nezměnily se ani po revakcinaci (obr. 6).

Test LAI byl prováděn zároveň celkem u 25 odběrů krve telat kontrolních; průměrná hodnota inhibice adherence byla stanovena na 4,64 %.

U devíti účinně imunizovaných telat dosahují hodnoty testu LMI šestý den po imunizaci téměř 50 % inhibice migrace leukocytů; po 15 dnech dochází k poklesu. Po revakcinaci (21. den) se během čtyř dnů inhibice migrace leukocytů výrazně zvýšila, přibližně na stejnou úroveň jako po první imunizaci.

Naopak u tří telat po nedostatečné imunizaci dosahovaly hodnoty v testu LMI po celou sledovanou dobu méně než 20 % inhibice migrace leukocytů (obr. 7).

U kontrolních telat byla v LMI zjištěna průměrná hodnota 5,52 %.

Výrazná protilátková odezva na vakcinaci byla u většiny imunizovaných telat zjištěna testem ELISA až v rámci sekundární odpovědi po revakcinaci. Střední hodnota titru IBR protilátek 14. den po revakcinaci byla 1 : 12 580. U pěti telat pak byly zjištěny IBR protilátky také 20. den po první imunizaci v rozmezí titrů 1 : 50 až 1 : 480.

Uvedené výsledky lze shrnout do těchto bodů:

1. Aplikace inaktivované adjuvantní vakcíny proti IBR vyvolala celkovou a specifickou imunitní odpověď, kterou bylo možné dokumentovat sérologicky (ELISA) a pomocí testů hodnotících buňkami zprostředkovanou imunitu (LAI, LMI). Kromě toho imunní zvířata nevyučovala virus IBR na sliznici nosní po čelenžní infekci virulentním kmenem IBR, provedené za 30 dnů po revakcinaci.

2. U některých telat se nedostatečná imunita po vakcinaci projevila jednak modifikovaným průběhem celulárních imunitních reakcí, jednak vylučováním viru IBR na nosní sliznici po čelenžní infekci. Virus IBR však byl vylučován v mnohem menší míře a podstatně kratší dobu než u telat pouze experimentálně infikovaných.

3. Dynamika změn v reakcích buňkami zprostředkované imunity se po experimentální infekci a po vakcinaci telat vyvíjela nezávisle na dynamice humorální reakce.

4. Celková imunitní reakce zprostředkovaná buňkami nastupuje rychleji u telat experimentálně infikovaných než u telat vakcinovaných.

Vyšetření krevních vzorků testem LAI při sledování kinetiky buňkami zprostředkované imunity u telat experimentálně infikovaných i vakcinovaných proti IBR je v této práci původní.

Ze získaných výsledků lze vyvodit, že odpověď v testu LAI byla nejvyšší při prvním setkání organismu s virovým antigenem. Další stimuly organismu ať vylučovaným virem, nebo revakcinační sekundární reakci výrazně nezvyšovala. Rovněž Holáň aj. (1974) a Powell aj. (1978) uvádějí, že po imunizaci zvířat se v testu LAI snižuje schopnost leukocytů adherovat. Holt aj. (1979) infikovali myši živými bakteriemi BCG a zjistili maximální odpověď v testu LAI desátý den po infekci.

Podobně jako v testu LAI byly i v testu LMI zjištěny nejvyšší hodnoty inhibice migrace leukocytů do 20. dne po infekci nebo imunizaci. Tyto výsledky souhlasí s údaji u telat imunizovaných proti IBR (Holt aj., 1979; Hussain a Mohanty, 1979; Gutekunst, 1979). Naopak Bendixen (1977) uvádí stále stejné hodnoty bez ohledu na dobu trvání infekce u krav infikovaných bakteriemi *Mycobacterium paratuberculosis*.

Oba testy jsou nenáročné na chemikálie a provedení; k vyhodnocení testu LAI je však nutné použít spektrofotometr Multiskan. Výsledky tohoto testu mohou být negativně ovlivněny jakostí povrchu jamek při opakovaném použití mikrodisek; schopnost leukocytů adherovat k povrchu je dále ovlivněna i kvalitou povrchu nově použitých mikrodisek; byly zjištěny značné rozdíly ve výsledcích testu LAI při použití mikrodisek různých šarží.

Test LMI, i když vyžaduje delší dobu inkubace (16–20 hodin), lze snadno hodnotit světelným mikroskopem. Migrace leukocytů není výrazněji ovlivněna povrchem použitých Petriho misek, takže výsledky tohoto testu jsou reprodukovatelnější; navíc spotřeba antigenu u testu LMI je přibližně pětkrát nižší než u testu LAI.

Obou testů lze užít nejen ke sledování stavů buněčné imunity — tj. schopností odpovědět na příslušný antigenní podnět, ale i pro kontrolu účinnosti vakcín a vakcinačních postupů. V současné době jsou proto tyto testy doporučeny ke kontrole účinnosti vakcíny proti salmonelóze vyráběné v Biovetě Nitra a v Biovetě Ivanovice na Hané. Nezdá se však, že by se těmito testy dala odlišit postinfekční a postvakcinační imunita.

Bylo by prospěšné aplikovat tyto metody i na další virové nebo bakteriální nákazy a zároveň s dalšími testy specifické a nespecifické imunity jich využít při prověřování imunitního stavu jednotlivých druhů zvířat, což je důležité při eliminaci nákaz.

Literatura

- BENDIXEN, P. H.: Application of the direct leukocyte-migration agarose test in cattle naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. Amer. J. veter. Res., 38, 1977, s. 66-73.
- CLAUSEN, J. E.: Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leukocytes in agarose medium. Acta allergol., 26, 1971, s. 56-80.
- CLAUSEN, J. E.: Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral blood leukocytes after 2, 4 and 20 hours in agarose culture. Acta allergol., 28, 1973, s. 28-41.

- FIELD, E. W. — SMITH, M. H.: Cell-mediated immune response in cattle to bovine respiratory syncytial virus. *Amer. J. veter. Res.*, 45, 1984, s. 1641-1643.
- GOLDROSEN, M. H. — HOWELL, J. H. — HOLYOKE, E. D.: Demonstration at the microtest version of the leucocyte adherence inhibition assay. *Canc. Res.*, 39, 1979, s. 630-632.
- GUTEKUNST, D. E.: Cellular immunity shown in *Pseudorabies* virus-infected pigs by leukocyte migration-inhibition procedure. *Amer. J. veter. Res.*, 40, 1979, s. 66-68.
- HOLÁŇ, V. — HAŠEK, M. — BUBENÍK, J. — CHUTNÁ, J.: Antigen mediated macrophage adherence inhibition. *Cell. Immunol.*, 13, 1974, s. 107-116.
- HOLT, P. G. — FIMMEL, P. J. — FINLAY-JONES, L. M. — FLOWER, R. L.: Evaluation of the microplate leukocyte adherence inhibition test and its reproducibility sensitivity and relationship to other tests of cellular immunity. *Canc. Res.*, 39, 1979, s. 564-569.
- HUSSAIN, A. — MOHANTY, S. B.: Cell-mediated immunity to bovine rhinovirus type in calves. *Arch. Virol.*, 1979, s. 17-27.
- PAYMENT, P. — ASSAF, R. — TRODEL, M. — MARDS, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay for serology of infectious bovine rhinotracheitis virus infections. *J. clin. Microbiol.*, 10, 1979, s. 633-637.
- POWELL, A. E. — SLOSS, A. M. — SMITH, R. N.: Leukocyte-adherence inhibition. A specific assay of cell mediated immunity dependent on lymphokine-mediated collaboration between T lymphocytes. *J. Immunol.*, 120, 1978, s. 1957-1962.
- PSÍKAL, I. — MENŠÍK, J. — CHLUPOVÁ, L. — FRANZ, J. — PECKA, F. — ŠTĚPÁNEK, J. — TOMAN, M. — JURÁK, E. — ŽUFFA, A. — KALAS, Z.: Současná epizootologická situace viru IBR/IPV ve velkochovách skotu a problematika jejího tlumení. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1984. 40 s.
- REED, L. J. — MUENCH, H.: A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27, 1938, s. 493-497.
- ŠTĚPÁNEK, J. — PSÍKAL, I. — FRANZ, J. — TOMAN, M. — VALÍČEK, L. — SMÍD, B. — SVOBODA, I. — MENŠÍK, J.: Detekce a identifikace bovinního rotaviru. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1983. 50 s.
- THOMSON, D. M. P.: Demonstration of tube leukocyte adherence inhibition assay with coded samples of blood. *Canc. Res.*, 39, 1979, s. 627-629.

Došlo dne 4. 10. 1988

ГРАНАТОВА, М. — ПШИКАЛ, И. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Посредничество иммунитета клетками у телят иммунизированных или инфицированных вирусом инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота. *Veter. Med. (Praha)*, 34, 1989 (7) : 385-394.

В настоящей работе описаны простые и быстрые методы — ингибирование адгезии лейкоцитов — LAI и ингибирование мигрирования лейкоцитов LMI, при помощи которых можно исследовать через клетки посреднический иммунитет у животных. Совместно с серологическими и вирусологическими методами оба теста использовались для обследования изменений иммунитетного состояния телят после экспериментальной инфекции вирусом IBR и после иммунизации инактивированной масляной вакциной против IBR. Полученные результаты показали, что динамика изменений в иммунитете при посредничестве клеток, после экспериментальной инфекции и вакцинации телят развивалась независимо от динамики влажной реакции. Общая иммунитетная реакция полученная посредством клеток наступала ранее у телят экспериментально инфицированных, чем у телят вакцинированных. У некоторых вакцинированных телят был установлен модифицированный ход клеточных иммунитетных реакций, который помимо этого проявился и излучением вируса IBR на слизистой оболочке носа после лобовой инфекции. Тесты LAI и LMI можно рекомендовать как для иммунологического контролирования в клинической лаборатории, так и для научно-исследовательской работы.

ингибирование адгезии лейкоцитов — LAI; ингибирование миграции лейкоцитов — LMI; инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота — IBR; посредничество иммунитета клетками

GRANÁTOVÁ, M. — PŠIKAL, I. (Veterinary Research Institute, Brno): *Cell-mediated Immunity in Calves Immunized or Infected by Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus*, Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 385-394.

Simple and expeditious methods — leucocyte adherence inhibition LAI and leucocyte migration inhibition LMI — are described in the present paper; these methods enable to investigate cell-mediated immunity of animals. The two tests, along with serological and virological methods, were used to study changes in the immunity of calves after experimental infection by IBRV and after immunization by inactivated oil vaccine against IBRV. The results have indicated that the changes in cell-mediated immunity after experimental infection and vaccination of calves assumed courses independent of the changes in humoral reaction. Total cell-mediated immunity reaction started earlier in experimentally infected calves than in vaccinated ones. In some vaccinated calves a modified course of cellular immunity reactions was observed, characterized also by elimination of IBR virus on the nasal mucous membrane after challenge infection. The LAI and LMI test can be recommended for immunological monitoring in clinical laboratories and in research.

leucocyte adherence inhibition — LAI; leucocyte migration inhibition — LMI; infectious bovine rhinotracheitis — IBR; cell-mediated immunity

GRANÁTOVÁ, M. — PŠIKAL, I. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Zellvermittelte Immunität bei durch das Virus der infektiösen bovinen Rhinotracheitis immunisierten oder infizierten Kälbern*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 385-394.

In der vorliegenden Arbeit werden einfache und rasche Methoden beschrieben — Adhärenzinhibition der Leukozyten — LAI und die Migrationsinhibition der Leukozyten — LMI, mittels deren die durch Zellen übermittelte Immunität bei Tieren verfolgt werden kann. Zusammen mit serologischen und virologischen Methoden wurden diese beiden Tests zum Untersuchen der Veränderungen des Immunzustands von Kälbern nach experimenteller Infektion durch das IBR-Virus und nach einer Immunisierung durch inaktivierte Ölvakzine gegen IBR angewandt. Die gewonnenen Ergebnisse erwiesen, daß sich die Dynamik der Veränderungen bei zellvermittelter Immunität nach der experimentellen Infektion und Vakzination der Kälber unabhängig von der Dynamik der humoralen Reaktion entwickelte. Die zellvermittelte Gesamtimmunreaktion trat bei experimentell infizierten Kälbern früher ein als bei den vakzinierten. Bei einigen vakzinierten Kälbern war ein modifizierter Verlauf der zellulären Immunreaktion zu verzeichnen, der daneben auch durch Absonderung des IBR-Virus auf der Nasenschleimhaut nach Challenge-Infektion zum Ausdruck kam. Die Tests LAI und LMI sind sowohl für immunologisches Monitoring im klinischen Labor als auch für Forschungsarbeiten zu empfehlen.

Adhärenzinhibition der Leukozyten — LAI; Migrationsinhibition der Leukozyten — LMI; infektiöse bovine Rhinotracheitis — IBR; zellvermittelte Immunität

Adresa autorů:

RNDr. Marta Granátová, MVDr. Ivan Pšikal, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

ZDRAVOTNÝ STAV A METABOLICKÉ UKAZOVATELE U TELIAT NAPÁJANÝCH MLEDZIVOM A NEZRELÝM MLIEKOM KONZERVOVANÝM SORBANOM DRASELNÝM A MLIEČNOU KŔMNOU ZMESOU

J. Brouček, D. Gajdošík, K. Kovalčík, V. Brestenský

BROUČEK, J. — GAJDOŠÍK, D. — KOVALČÍK, K. — BRESTENSKÝ, V. (Výskumný ústav živočišnej výroby, Nitra; Štátny veterinárny ústav, Nitra): *Zdravotný stav a metabolické ukazovatele u teliat napájaných mledzivom a nezrelým mliekom konzervovaným sorbanom draselným a mliečnou kŕmnou zmesou*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 395-402.

Zmyslom práce bolo zistiť, či konzervácia mleziva a nezrelého mlieka sorbanom draselným v koncentrácii 0,5 % a jeho uchovávanie tri až päť dní pri normálnej teplote prostredia nemá negatívny vplyv na zdravotný stav teliat. Použili sme 30 teliat, ktoré boli rozdelené do dvoch skupín. Teľatá pokusnej skupiny sa napájali od 9. do 30. dňa veku (prvé experimentálne obdobie) konzervovaným mledzivom a nezrelým mliekom, od 31. do 50. dňa (druhé experimentálne obdobie) mliečnou kŕmnou zmesou. Teľatá kontrolnej skupiny sa napájali od 9. do 50. dňa mliečnou kŕmnou zmesou. Z pokusnej skupiny uhynulo jedno teľa na ochorenie dýchacieho aparátu. V kontrolnej skupine bol tiež jeden úhyn a jedno teľa bolo nutne odporazené, v oboch prípadoch bolo diagnostikované ochorenie tráviacich orgánov. Tiež počet liečených zvierat bol priaznivejší u teliat napájaných konzervovaným mledzivom — zistili sme jeden prípad periodickej tympanie, u kontrolnej skupiny mali túto diagnózu štyri choré zvieratá. Pri sledovaní hematologických a biochemických ukazovateľov sme zistili signifikantne nižšiu hladinu hemoglobínu u pokusných zvierat na konci prvého experimentálneho obdobia ($105,4 \text{ g.l}^{-1}$ oproti $112,2 \text{ g.l}^{-1}$) a vysoko preukazne vyššiu koncentráciu proteínémie v tom istom sledovaní ($59,6 \text{ g.l}^{-1}$ oproti $53,8 \text{ g.l}^{-1}$). Podobné rozdiely sme stanovili aj pri jednorazovom hematologicko-biochemickom vyšetrení.

teľatá; konzervované mledzivo; sorban draselný; zdravotný stav; biochemické ukazovatele

Pre optimálne využitie prebytočného mledziva a nezrelého mlieka je dôležité ich dlhodobé uchovanie pri nezmenenej kvalite. Zmrazovanie sa odporúča väčšinou pre mledzivo z prvého dňa po otelení (Skřivánková a i., 1984), počíta sa aj s lyofilizáciou. V praktických podmienkach sú však tieto spôsoby ťažko realizovateľné, najmä keď uvažíme pomerne veľké množstvá mledziva a nezrelého mlieka z druhého až piateho dňa po otelení (Meyer a i., 1982). Laboratórnymi rozbormi a experimentom na zvieratách sme stanovili ako najvhodnejší prídavok pre konzerváciu mledziva uchovávaného pri normálnej teplote sorban draselný. Teľatá napájané od 9. do 30. dňa veku mledzivom a nezrelým mliekom konzervovaným sorbanom draselným (0,5 %) a uchovávaným tri až päť dní pri normálnej teplote mali vysoko signifikantne vyšší priemerný denný prírastok ($0,719 \text{ kg}$) oproti kontrolnej skupine ($0,493 \text{ kg}$) kŕmnej zmesi (Brouček a i., 1989).

Kvalita mledziva je dôležitá najmä pre uliahnuté teľatá, aby sa vytvorila pasívna imunita. Imunologická hodnota mledziva je určená pre-

dovšetkým obsahom imunoglobulínov. Pokiaľ ide o ich vstrebávanie, zistili Ha j d u a i. (1977), že maximálne hodnoty dosiahli teľatá za 24 hodín po narodení. Teľatá sa totiž rodia s fyziologickou agamaglobulinémiou a kolostrum matky je tak jediným zdrojom imunoglobulínov. Nástup vlastnej imunopoézy je datovaný od konca prvého týždňa veku. Paulík a i. (1983) zaznamenali v postnatálnom vývoji najnižšiu hladinu imunoglobulínov a celkových bielkovín séra v treťom a štvrtom týždni života. J a g o š a i. (1986) porovnávali biochemické ukazovatele u teľiat kŕmených plnotučným mliekom a Laktosanom. Zistili, že obsah močoviny v krvnej plazme bol v štvrtom až siedmom týždni u prvej skupiny významne nižší. Minerálne látky boli v medziach referenčných hodnôt. Prírastky boli vyššie u teľiat kŕmených mliekom. Ukazovatele metabolického profilu u zdravých teľiat stanovili Slanina a B e s e d a (1979) a Bouda a J a g o š (1984).

MATERIÁL A METÓDA

Použili sme 30 teľiat (18 jalovičiek a 12 býčkov) čiernostrakatého plemena vo veku 7 až 12 dní, ktoré boli rozdelené do dvoch skupín. V profylaktórnom období boli napájané čerstvým mledzivom a nezrelým mliekom. Po zaradení do experimentu sa teľce pokusnej skupiny napájali až do 30. dňa veku tri až päť dní starým zmesným mledzivom a nezrelým mliekom, ktoré bolo konzervované sorbanom draselným (0,5 %) a uchovávané pri normálnej teplote (prvé experimentálne obdobie). Od 31. do 50. dňa sa kŕmili mliečnou kŕmnou zmesou Laktavit (druhé experimentálne obdobie). Teľatá kontrolnej skupiny sa od deviateho dňa do odstavu napájali Laktavitom riedeným v pomere 1:9. Konzervované mledzivo a nezrelé mlieko a Laktavit sa podávali ohriate na teplotu 38 °C. Seno a štartérová kŕmna zmes sa podávali *ad libitum*. Krv sme odoberali tesne pred presunom z pôrodnice, potom v 30., 60. a 90. dni veku. Okrem toho sa raz v priebehu pokusu odobrala krv na jednorazové vyšetrenie. Hematokrit sme stanovovali mikrocentrifúgou, počet leukocytov počítaním v Bürkerovej komôrke, leukogram farbením panoptickou metódou s následným vyhodnotením 100 buniek, hemoglobín, močovinu, nebielkovinový dusík, celkové bielkoviny, glukózu, aspartátaminotransferázu, horčík, fosfor a železo Bio-La-testami, celkové imunoglobulíny podľa autorov Slanina a i. (1976), nárazníkovú kapacitu krvi metódou, ktorú popísal Lebeda (1970), sodík, draslík a vápnik plameňofotometricky, tyroxín a inzulín rádioimunologickými metódami (RIA kity UVRJT Košice a IAE-IPRC Otwock). Zdravotný stav bol sledovaný permanentne, uhynuté teľatá pitvali pracovníci ŠVÚ Nitra. Sorban draselný vyrobili v n. p. LACHEMA Kaznějov.

VÝSLEDKY

ZDRAVOTNÝ STAV

V prvom experimentálnom období sa u teľiat kŕmených konzervovaným mledzivom a nezrelým mliekom neprejavila žiadna porucha digestívneho aparátu. Teľa č. 23540 bolo tri dni liečené na ochorenie dýchacích orgánov, štvrtý deň (30. 7. 1987) uhynulo za príznakov asfyxie vo veku 21 dní. Bolo pitvané na ŠVÚ Nitra. Za dôvod úhynu bol patologicko-anatomickým vyšetrením určený respiračný syndróm. Z kontrolnej skupiny bolo teľa č. 54532 nutne odporazené pre akútnu anorexiu spojenú s inapetenciou (30. 7. 1987) vo veku 31 dní.

V druhom experimentálnom období po prechode pokusnej skupiny na napájanie Laktavitom sme zistili jeden prípad periodickej tympanie (č. 54531). V kontrolnej skupine sme toto ochorenie diagnostikovali a liečili u štyroch teľiat (23539, 54532, 54537, 54538). Z týchto postihnutých zvierat býček č. 23539 vo veku 36 dní uhynul.

Obsah hemoglobínu v krvi teliat pokusnej skupiny (tab. I) bol vo všetkých sledovaniach vyšší než u skupiny kontrolnej. Štatisticky výrazný rozdiel bol zistený na konci prvého experimentálneho obdobia ($105,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, $112,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$). V hematokrite bol najväčší rozdiel tiež v tomto odbere, ale štatisticky nepreukazný ($0,324 \text{ l} \cdot \text{l}^{-1}$ oproti $0,350 \text{ l} \cdot \text{l}^{-1}$).

Hladina celkových bielkovín bola na začiatku experimentu rovnaká ($56,6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a $56,9 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$), ale pri ďalšom porovnaní sme zaznamenali celkovú proteínémiu u teliat napájaných mledzivom vysoko signifikantne vyššiu ($59,6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ oproti $53,8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$). Pri odstave od mliečnej výživy bol rozdiel v prospech pokusnej skupiny $1,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, ale v 90. dni veku sme zistili opäť vysoko výraznú diferenciu. V obsahu imunoglobulínov sme ani v jednom sledovaní nezaevidovali výraznejší rozdiel.

Obsah nebielkovinového dusíka (tab. II) bol v druhom a treťom pozorovaní mierne vyšší u pokusnej skupiny, rozdiely však boli minimálne, podobne ako v prípade ďalších ukazovateľov — glukózy a inzulínu. Koncentrácie hormónu štítnej žľazy, tyroxínu, sa mierne zvýšila u zvierat kŕmených konzervovaným mledzivom na konci prvého experimentálneho obdobia ($47,9 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v porovnaní s $43,7 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) a tento trend sa udržal až do 90. dňa veku.

JEDNORÁZOVÉ HEMATOLOGICKO-BIOCHEMICKÉ VYŠETRENIE

Krv pre jednorazové vyšetrenie sme odobrali u 20 zvierat (10 z pokusnej a 10 z kontrolnej skupiny). Všetky vyšetrované telce boli v období mliečnej výživy, z toho väčšina pred koncom prvej experimentálnej periódy. V bielom krvnom obraze sme nezistili preukazné rozdiely (tab. III). Pokusná skupina mala vyššie percento lymfocytov (o 5,2 %) a nižší obsah neutrofilných granulocytov (o 4,9 %), následkom čoho sa stanovil širší pomer lymfocytov k neutrofilom ($1,15$ oproti $0,99$ u kontrolnej skupiny).

Signifikantnú diferenciu sme vypočítali v ukazovateľoch červeného krvného obrazu. Obsah hemoglobínu a hematokrit boli u zvierat napájaných ošetrovaným mledzivom o $8,6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a $0,045 \text{ l} \cdot \text{l}^{-1}$ nižší.

Z biochemických ukazovateľov (tab. IV) sú hladiny glykémie vyrovnané a informujú o dostatočnom krytí potreby energie. Aktivita aspartátaminotransferázy ako indikátora akútneho pečenej ochorenia alebo svalových ochorení nie je zvýšená ani u jednej skupiny. Koncentrácia močoviny bola u pokusnej skupiny nepreukazne zvýšená ($7,34 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ oproti $5,23 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Bolo to spôsobené patologickou hodnotou u teľaťa č. 23540 ($17,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Obsah celkových bielkovín bol podobne ako pri predchádzajúcich sledovaniach štatisticky vysoko preukazne vyšší u pokusnej skupiny ($55,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ oproti $50,3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$). Acidobázny profil nebol ani u jednej skupiny narušený.

V minerálnom profile vidieť všeobecnú tendenciu k hypomagneziémii u obidvoch skupín. Hladiny ostatných makroprvkov (tab. V) sú v hraniciach referenčného rozpätia okrem koncentrácie u zvierťaťa č. 23540 z pokusnej skupiny, ktoré ju má patologicky zvýšenú ($6,7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Táto zmena je však individuálna a neovplyvňuje priemer skupiny. Z mikroprvkov je hladina železa v hraniciach referenčného rozpätia. Nálež svedčí o prívode železa zodpovedajúcom jeho potrebe.

I. Zmeny červeného krvného obrazu a proteínového metabolizmu sledovaných teliat počas experimentu — Changes in red blood cell counts and in protein metabolism of calves examined during the trial

Ukazovateľ	Skupina	Začiatok experimentu			Koniec skrmovania konzervovaného mlieka			Odstav od mliečnej výživy			90. deň veku		
		$\bar{x}$	s	rozdiel	$\bar{x}$	s	rozdiel	$\bar{x}$	s	rozdiel	$\bar{x}$	s	rozdiel
Hemoglobín (g.l ⁻¹)	P	105,4	5,1	—3,5	105,4	6,3	—6,8 ⁺	106,1	5,1	—2,5	105,8	4,5	—1,3
	K	108,9	4,9		112,2	7,8		108,6	5,0		107,1	5,6	
Hematokrit (l.l ⁻¹)	P	0,320	0,020	0,001	0,324	0,028	—0,026	0,328	0,024	—0,008	0,328	0,021	—0,007
	K	0,319	0,014		0,350	0,041		0,336	0,017		0,335	0,015	
Celkové bielkoviny (g.l ⁻¹)	P	56,6	4,4	—0,3	59,6	4,1	5,8 ⁺⁺	61,0	2,0	1,7	59,9	1,3	2,1 ⁺⁺
	K	56,9	4,8		53,8	4,8		59,3	2,6		57,8	1,0	
Imunoglobulíny U ZST	P	17,78	2,39	—0,06	15,36	1,78	—0,02	23,93	1,77	0,16			
	K	17,84	2,19		15,38	1,76		23,77	1,59				

P = pokusná skupina (n = 14); K = kontrolná skupina (n = 13)

+ P < 0,05; ++ P < 0,01

II. Zmeny biochemických ukazovateľov a hormónov v krvnom sére sledovaných teliat počas experimentu — Changes in biochemical characteristics and hormone concentrations in the blood serum of calves examined during the trial

Ukazovateľ	Skupina	Začiatok experimentu			Koniec skrmovania konzervovaného mlieka			Odstav od mliečnej výživy			90. deň veku		
		$\bar{x}$	s	rozdiel	$\bar{x}$	s	rozdiel	$\bar{x}$	s	rozdiel	$\bar{x}$	s	rozdiel
Dusík nebielkovinový (mmol.l ⁻¹)	P	2,42	0,16	0,00	2,75	0,41	0,21	2,51	0,23	0,17	2,43	0,25	0,05
	K	2,42	0,34		2,54	0,44		2,34	0,27		2,38	0,24	
Glukóza (mmol.l ⁻¹)	P	4,50	0,28	-0,18	4,48	0,32	0,11	4,24	0,19	0,06	4,30	0,27	0,04
	K	4,68	0,46		4,37	0,80		4,18	0,18		4,26	0,19	
Inzulín (μUI.ml ⁻¹)	P	16,3	5,0	-0,9	17,1	5,5	-1,2	14,6	2,4	-0,4	15,6	3,7	0,7
	K	17,2	7,6		18,3	6,7		15,0	4,8		14,9	3,5	
Tyroxín (nmol.l ⁻¹)	P	43,3	8,8	-2,1	47,9	12,3	4,2	45,0	7,6	1,4	49,5	7,6	3,8
	K	45,4	14,7		43,7	9,3		43,6	6,4		45,7	7,4	

P = pokusná skupina (n = 14); K = kontrolná skupina (n = 13)

III. Profilový metabolický test — hematologické ukazovatele — Metabolic profile test — haematological characteristics

Ukazovateľ	Pokusná skupina		Kontrolná skupina		Rozdiel
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	
Počet leukocytov ($10^{-1} \cdot l^{-1}$)	8,75	2,63	9,73	2,47	-0,98
Hemoglobín ($g \cdot l^{-1}$)	103,30	7,60	111,90	8,70	-8,60 ⁺
Hematokrit ($l \cdot l^{-1}$)	0,312	0,042	0,357	0,043	-0,045 ⁺⁺
Počet lymfocytov (%)	50,10	12,10	44,90	14,80	5,20
Počet neutrofilov (%)	49,50	12,50	54,40	14,60	-4,90
Pomer lymfocytov: neutrofilom	1,15	0,67	0,99	0,71	0,16

+ $P < 0,05$ $n = 10$

IV Profilový metabolický test — biochemické ukazovatele — Metabolic profile test — biochemical characteristics

Ukazovateľ	Pokusná skupina		Kontrolná skupina		Rozdiel
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	
Glukóza ($mmol \cdot l^{-1}$)	4,22	0,70	4,39	0,92	-0,17
Močovina ($mmol \cdot l^{-1}$)	7,32	3,53	5,23	1,18	2,11
Aspartátaminotransferáza ($\mu kat \cdot l^{-1}$)	0,35	0,09	0,39	0,10	-0,04
Celkové bielkoviny ($g \cdot l^{-1}$)	55,50	3,10	50,30	2,90	5,20 ⁺⁺
Nárazníková kapacita krvi ($mmol \cdot l^{-1}$)	28,00	1,97	28,20	2,06	-0,20

++ $P < 0,01$ $n = 10$

V. Profilový metabolický test — minerálny metabolizmus — Metabolic profile test — mineral metabolism

Ukazovateľ	Pokusná skupina		Kontrolná skupina		Rozdiel
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	
Sodík ($mmol \cdot l^{-1}$)	136,70	2,50	137,50	2,90	-0,80
Draslík ($mmol \cdot l^{-1}$)	5,48	0,54	5,24	0,32	0,24
Vápnik ($mmol \cdot l^{-1}$)	2,46	0,12	2,39	0,09	0,07
Horčík ($mmol \cdot l^{-1}$)	0,65	0,07	0,61	0,05	0,04
Fosfor ($mmol \cdot l^{-1}$)	2,66	0,25	2,53	0,24	0,13
Železo ($\mu mol \cdot l^{-1}$)	24,50	5,50	28,30	7,80	-3,80

$n = 10$

Cieľom práce bolo zistiť, či konzervovanie mledziva a nezrelého mlieka sorbanom draselným a uchovávanie takto ošetrovaného krmiva pri normálnej teplote nemá negatívny vplyv na zdravotný stav teliat. Zámerne sme experiment uskutočnili v letnom období, kedy by sa mohlo prejaviť najviac tráviacich porúch z nevhodne konzervovaného mlieka. V skutočnosti však bol zdravotný stav v pokusnej skupine výrazne lepší, najmä pokiaľ ide o ochorenie tráviaceho traktu. Príklady hnačkových ochorení a tympanií spojených s inapetenciou u kontrolnej skupiny môžu vysvetliť aj rozdiely v obsahu hemoglobínu a hematokritu pri sledovaní na konci prvého experimentálneho obdobia a pri metabolickom teste. Vplyvom týchto enteritíd sa organizmus odvodňuje a dochádza k hemokoncentracii. Na tento stav upozornili Slanina a Beseda (1979) a Bouda a Jagoš (1984). Zvýšený obsah proteínémie u pokusnej skupiny má zreteľnú súvislosť s intenzívnejším rastom (Brouček a i., 1989).

Zaujímavé bolo zisťovanie príčin vyššej hladiny močoviny v sére teliat pokusnej skupiny. Spôsobil to býček č. 23540, ktorý mal patologicky zvýšenú nielen hladinu močoviny ($17,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), ale aj kália ($6,70 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), a po štyroch dňoch po odbere krvi sa u neho prejavila pneumónia, na ktorú po ďalších štyroch dňoch uhynul. V ostatných biochemických a hematologických ukazovateľoch sledovaných v 30., 60. a 90. dni veku, ako aj pri jednorazovom hematologickom a biochemickom vyšetrení v priemernom veku 28 dní, sa neprejavili výraznejšie rozdiely a hodnoty boli v rámci referenčných rozpätí, ktoré udávajú Slanina a Beseda (1979) a Bouda a Jagoš (1984).

Literatúra

- BOUDA, J. — JAGOŠ, P.: Biochemical and hematological reference values in calves and their significance for health control. *Acta Veter.* (Brno), 53, 1984, s. 137-142.
- BROUČEK, J. — KOVALČÍK, K. — GAJDOŠÍK, D. — FOLTÝS, V.: Vplyv skrmovania mledziva a nezrelého mlieka konzervovaného sorbanom draselným na prírastky hmotnosti teliat. *Živoč. Výr.*, 34, 1989, č. 2, s. 139-147.
- HAJDU, Š. — BLAHO, R. — HEČKO, R.: Štúdium humorálneho imunitného systému hovädzieho dobytká v postnatálnom období. II. časť. Imunoprofylaxia, 4, 1977, s. 45-64.
- JAGOŠ, P. — BOUDA, J. — SKŘIVÁNEK, M.: Vliv příjmu mléčné krmné směsi a plnotučného mléka na vývoj vybraných ukazatelů v krevní plazmě telat. *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986, č. 2, s. 65-73.
- LEBEDA, M.: Stanovení nárazníkové kapacity krve, plasmy a jiných tělních tekutin metodou potenciometrické titrace. *Veterinářství*, 20, 1970, č. 5, s. 229-230.
- MEYER, H. — LUSTERMAN, H. — STEINBACH, G. — LEIRER, R. et al.: Konservierung von Rinderkolostrum. *Mh. Veter. Med.*, 37, 1982, č. 1, s. 27-33.
- PAULÍK, Š. — SLANINA, L. — BOMBA, A. — POLÁČEK, M.: Imunobiokovínový profil teliat v zdravotne extrémnych podmienkach. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983, č. 11, s. 669-678.
- SLANINA, L. — BESEDA, I.: Metabolický profil hovädzieho dobytká vo vzťahu k zdraviu a úžitkovosti. Bratislava, Štátna veterinárna správa MPVŽ SSR 1979.
- SLANINA, L. — VAJDA, V. — BLAŽEJ, J.: Turbidimetrické stanovenie imunoglobulínov u teliat a ich klinické hodnotenie. *Veterinářství*, 26, 1976, s. 392-394.
- SKŘIVANOVÁ, V. — SKŘIVAN, M. — DOBŠINSKÝ, O.: Mražené mlezivo jako zdroj imunoglobulinů pro telata v prvních dnech života. *Živoč. Výr.*, 29, 1984, č. 2, s. 131-136.

Došlo dňa 17. 2. 1988

БРОУЧЕК, Я. — ГАЙДОШИК, Д. — КОВАЛЧИК, К. — БРЕСТЕНСКИ, В. (Научно-исследовательский институт животноводства, Нитра; Государственный ветеринарный институт, Нитра): Состояние здоровья и метаболические показатели у телят питаемых молозивом и незрелым молоком, консервированным сорбентом калиевым и молочной кормовой смесью. *Veter. Med. (Praha)*, 34, 1989 (7) : 395-402.

Целью работы было установить, не оказывает ли консервирование молозива и незрелого молока консервированное сорбентом калиевым в концентрации 0,5 % и его хранение 3—5 дней при нормальной температуре среды отрицательное влияние на состояние здоровья телят. Мы использовали 30 телят, которые были разделены на две группы. Телята опытной группы питались от 9 до 30 дневного возраста (первый экспериментальный этап) консервированным молозивом и незрелым молоком, с 30 по 50 дневный возраст (второй экспериментальный этап) молочной кормовой смесью. Телята контрольной группы питались от 9 до 50 дневного возраста молочной кормовой смесью. В опытной группе пал один теленок из-за заболевания дыхательного аппарата. В контрольной группе также пал один теленок, а другой теленок был взят на обязательный убой, в обоих случаях диагноз был — заболевание пищеварительных органов. Также количество телят, которых лечили было более удовлетворительным у телят питаемых консервированным молозивом — мы установили один случай, периодического вздутия, у контрольной группы было четыре животных больных этой болезнью. При исследовании гематологических и биохимических показателей мы установили обозначенный более низкий уровень гемоглобина у опытных животных в конце первого экспериментального периода (105,5 г. л по сравнению с 112,2 г. л) и высокодостоверно более высокую концентрацию протеинамии при том же исследовании. (59,6 г. л по сравнению с 53,8 г. л). Подобные различия мы установили и при одноразовом гематологическо-биохимическом исследовании.

телята; консервированное молозиво; сорбент калиевый; состояние здоровья; биохимические показатели

BROUČEK, J. — GAJDOŠÍK, D. — KOVALČÍK, K. — BRESTENSKÝ, V. (Research Institute of Animal Production, Nitra; State Veterinary Institute, Nitra): *Health Condition and Metabolic Characteristics in Calves Fed Potassium Sorbate Preserved Colostrum and Unripe Milk and Milk Replacer*. *Veter. Med. (Praha)*, 34, 1989 (7) : 395-402.

The aim of the experiments was to investigate the effects of the preservation of colostrum and unripe milk with potassium sorbate at a concentration of 0.5 % and of its storage for three to five days at normal environmental temperatures on the calf health condition. A set of 30 calves divided into two groups was included in the trial. Calves belonging to the experimental group were fed preserved colostrum and unripe milk from day 9 to day 30 of their life (the first experimental period), and from day 31 to day 50 (the second experimental period) milk replacer. Calves belonging to the control group were fed milk replacer from day 9 to day 50 of their life. One calf from the experimental group died from a respiratory disease. In the control group, one calf died and another had to be slaughtered; in both cases digestive tract diseases were diagnosed. The number of calves which had to be treated medically was also lower in the experimental group — in the calves fed preserved colostrum — one case of periodic tympany was recorded in comparison with four cases in the control group. When haematological and biochemical characteristics were examined, significantly lower haemoglobin levels were found in experimental calves at the end of the first experimental period (105.4 g.l⁻¹ when compared with 112 g.l⁻¹ in the control group) and significantly higher values of proteinemia were found in the blood plasma of these calves at the same period (59.6 g.l⁻¹ and 53.8 g.l⁻¹, respectively). Similar differences were also found during a single haematological and biochemical examination.

calves; preserved colostrum; potassium sorbate; health condition; biochemical characteristics

Adresy autorov:

Ing. Jan Brouček, CSc., ing. Kornel Kovalčík, DrSc., ing. Vojtech Brestenský, CSc., Výskumný ústav živočíšnej výroby, Hlohovská 2, 949 92 Nitra
MVDr. Dušan Gajdošík, Štátny veterinárny ústav, 949 01 Nitra

VÝSKYT *COXIELLA BURNETII* A *CHLAMYDIA PSITTACI* U HOVÄDZIEHO DOBYTKA V JUŽNÝCH ČECHÁCH

V. Lisák, J. Vošta, J. Řeháček

LISÁK, V. — VOŠTA, J. — ŘEHÁČEK, J. (Bioveta, n. p., Nitra; Vysoká škola zemědělská, České Budějovice; Virologický ústav SAV, Bratislava): *Výskyt Coxiella burnetii a Chlamydia psittaci u hovädzieho dobytká v južných Čechách*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 403-410.

V rokoch 1986 a 1987 sa v šiestich okresoch a 22 lokalitách Juhočeského kraja a v jednom okrese a jednej lokalite Západočeského kraja vyšetrilo metódou mikroaglutinácie (MAR) a metódou väzby komplementu (KFR) na protilátky proti *Coxiella burnetii* a *Chlamydia psittaci* celkove 747 kusov hovädzieho dobytká. Pozitívita na *C. burnetii* bola pri MAR 44,4 % a pri KFR 16,5 %. Pozitívita na *Chl. psittaci* bola 7,1 %. Zvlášť pozoruhodné je značné rozšírenie a vysoká pozitívita koxiellózy v skúmanej oblasti. Túto skutočnosť — vzhľadom na zrušenie uzavretého obratu chovov hovädzieho dobytká u nás — možno považovať ako potenciálne nebezpečenstvo pre vzplanutie Q horúčky u ľudí nielen v Juhočeskom kraji, ale aj mimo neho.

metóda mikroaglutinácie (MAR); metóda väzby komplementu (KFR); Q horúčka; protilátky

V južných Čechách sa prítomnosť *C. burnetii* dokázala až v roku 1968 podľa protilátok u hlodavcov *Clethrionomys glareolus* zachytených v okrese České Budějovice (Řeháček a i., 1977). V ďalších rokoch tento nález opäť potvrdila séropozitívita drobných hlodavcov. Neskoršie sérologické šetrenia domácich zvierat, hovädzieho dobytká, oviec a koní v rôznych lokalitách Juhočeského kraja, ktoré sa robili v rokoch 1972 až 1976, preukázali pozitívitu iba u 1,3 % testovaných zvierat (Řeháček a i., 1977). Od roku 1977 sa pozorovanie koxiellózy a chlamydiózy v južných Čechách sústredilo na podhorie Šumavy a najmä na chránenú krajinnú oblasť (šumavský odchov aj importované zvieratá). Zámery sa upreli predovšetkým na hovädzí dobytok, ktorý sa v rámci kooperácie medzi poľnohospodárskymi podnikmi privážal z južnej Moravy na pasienkový odchov. Výsledky preukázali možnosť zavlečenia infekcie *C. burnetii* privázanými zvieratami. Súčasne sa však manifestovala možnosť vzniku ohnísk, pretože dochádzalo ku infekcii drobných cicavcov na pastvinách, na ktorých sa pásol dobytok (Řeháček a i., 1987).

Táto štúdia prezentuje výsledky dvojročného sledovania protilátok proti *C. burnetii* a *Chl. psittaci* v chovoch hovädzieho dobytká, zvlášť produkčných kráv, v rôznych lokalitách Juhočeského kraja. Rušenie

uzavretého obratu stád, ku ktorému dochádzalo v posledných rokoch, spôsobilo totiž nekontrolovateľné šrenie rôznych patogénnych agensov, medzi ktoré náležia — predpokladáme — aj oba uvedené patogény.

MATERIÁL A METÓDY

V rokoch 1986 až 1987 sme vyšetrili 747 kusov hovädzieho dobytku z 22 lokalít Juhočeského kraja a z jednej lokality zo Západočeského kraja (Klatovy). Vo väčšine lokalít sme vyšetrenia robili tri razy, v štyroch dva razy, v jednej raz.

Protilátky proti *C. burnetii* v sérach zvierat sme preukazovali metódou mikroaglutinácie (MAR) a metódou väzby komplementu (KFR) s antigénmi druhej fázy. Protilátky voči *Chl. psittaci* sme dokazovali len metódou väzby komplementu.

VÝSLEDKY

VYŠETRENIE HOVÄDZIEHO DOBYTKA NA PROTILÁTKY PROTI *C. BURNETII* (TAB. I A II)

V dvoch okresoch — Jindřichův Hradec a Tábor — prekročila celková pozitivita *C. burnetii* 50 % stavu vyšetrovaných zvierat (metódou MAR). V ostatných okresoch bola nižšia.

V dvoch poľnohospodárskych závodoch okresu Jindřichův Hradec bolo rozpätie premorenia *C. burnetii* podľa protilátkovej odpovede pri metóde MAR 50,0 až 58,3 % a pri metóde KFR 33,3 %. Celý okres mal teda pozitivitu 54,16 %, prípadne 33,3 %.

V okrese České Budějovice vykazuje vyšetrenie hovädzieho dobytku v siedmich lokalitách pozitivitu pri MAR 45,6 % a pri KFR 13,5 % s celkovým rozpätím podľa jednotlivých lokalít pri MAR 16,7 až 63,9 % a pri KFR 2,8 až 27,8 %. V lokalite Žabovřesky je ukazovateľ pri MAR až 63,9 %, kým pri KFR 8,3 %. Najnižšia pozitivita MAR (16,7 %) je v lokalite Koloměřice, kde bol najvyšší titer protilátok u jedného vyšetreného kusa 1:32, rovnako ako pri titre KFR protilátok 1:16. Prevalencia (štyri zvieratá) je pri titre protilátok MAR 1:8 (66,6 %). V tejto lokalite sú KFR protilátky výhradne v titri 1:8. V celom okrese České Budějovice je najvyššia frekvencia v hladinách protilátok 1:8 (23,5—33,0 %) a 1:16 (22,5—23,5 %) podľa oboch spôsobov vyšetrenia.

Päť poľnohospodárskych závodov v okrese Strakonice vykazuje síce pozitivitu pri *C. burnetii* u MAR 38,2 % a u KFR 10,4 %, lenže rozpätie positivity je 16,7 až 61,1 %, a to pri titroch protilátok 1:8 až 1:16 nad 60,0 %. Tieto hodnoty sa nevynímajú ani pri najvyššej pozitivite v lokalite Albrechtice, v ktorej MAR ukazuje 61,1 %, ale KFR 2,8 % protilátok, a to v titroch 1:8. V lokalite Bohumilice sa stretávame so zvláštnosťou. Pri pozitivite protilátok pri MAR 16,7 % je titer protilátok 1:128 a pri pozitivite KFR tak isto pri 16,7 % je titer protilátok 1:8.

V piatich lokalitách okresu Tábor je pozitivita MAR až nad 60,5 %, kým pri KFR je 23,8 % s prevahou v titroch protilátok MAR 1:8 (22,0 %), 1:16 (25,6 %) a — do istej miery prekvapujúce v ostatných súvislostiach — 1:128 (22,9 %), 1:256 (5,5 %). Pozitivita KFR je rozhodujúca v titroch 1:8. Pozitivita MAR je podľa poľnohospodárskych závodov v rozpätí 47,2 až 80,6 % a u KFR 19,4 až 30,6 %. Pozoruhodné nadväznosti sú zreteľné najmä v poľnohospodárskom závode Řepeč,

I. Vyšetrenie hovädzieho dobytku na protilátky proti *C. burnetii* a *Chl. psittaci* —
Examination of cattle for antibodies to *C. burnetii* and *Chl. psittaci*

Okres	Lokalita	Počet	<i>Coxiella burnetii</i>				<i>Chlamydia psittaci</i>	
			MAR		KFR		KFR	
			No	%	No	%	No	%
Jindřichův Hradec	Zdešov	24	14	58,3	8	33,3	0	0,0
	Bednárec	24	12	50,0	8	33,3	1	2,1
České Budějovice	Koloměřice	36	6	16,7	1	2,8	4	11,1
	Neplachov	36	18	50,0	10	27,8	2	5,6
	Záboří	36	17	47,2	10	27,8	0	0,0
	Žabovřesky	36	23	63,9	3	8,3	10	30,6
	Hosín	48	28	58,3	5	10,4	9	18,8
Strakonice	Čakovec	36	16	44,4	1	2,8	3	8,3
	Lhota pod Horami	24	7	29,2	4	16,7	3	12,5
	Slaník	36	7	19,4	3	8,3	5	13,9
	Přestovice	36	15	41,7	6	16,7	0	0,0
	Albrechtice	36	22	61,1	1	2,8	1	2,8
	Bohumilice	12	2	16,7	2	16,7	0	0,0
Tábor	Hliniště	24	9	37,5	3	12,5	1	4,2
	Bezděčín	36	17	47,2	7	19,4	1	2,8
	Rybova Lhota	36	22	61,1	9	25,0	2	5,6
	Oltně	36	18	50,0	8	22,2	2	5,6
	Řepeč	36	29	80,6	11	30,6	2	5,6
	Staré Sedlo	36	23	63,9	8	22,2	0	0,0
Písek	Sepekov	36	17	47,2	7	19,4	1	2,8
Prachatice	Kratochvíle	36	10	27,8	4	11,1	3	8,3
	Grejnarov	36	5	13,9	5	13,9	2	5,6
Klatovy	Dešenice	15	4	26,7	0	0,0	0	0,0

v ktorom je pozitivita pri MAR 80,6 % a pri KFR 30,6 %, pritom je značný titer protilátok proti *C. burnetii* 1 : 256 (13,7 %). V lokalitách tohto okresu je titer 5,5 % najpreukaznejší spomedzi lokalít vyšetovaných okresov.

Jeden poľnohospodársky závod v okrese Písek má pozitivitu *C. burnetii* pri MAR 47,2 %, opäť podstatnejšiu časť pri titre protilátok 1 : 8. Pozitivita KFR je 19,4 %, výlučne v najnižšom titre.

V okrese Prachatice sme vyšetrili hovädzí dobytok v dvoch poľnohospodárskych závodoch a pozitivita *C. burnetii* je pri MAR v rozpätí 13,9 až 27,8 % a pri KFR 11,1 až 13,9 %. U 53,3 % je titer protilátok 1 : 8. Vyššia pozitivita je v lokalite Kratochvíle.

Na Klatovsku je v jednom poľnohospodárskom závode pozitivita *C. burnetii* pri MAR 26,7 %, avšak najvyšší titer protilátok je 1 : 16. KFR pozitivitu nevykazuje.

II. Hladina protilátek proti *C. burnetii* u hovädzieho dobytku — The levels of antibodies to *C. burnetii* in cattle

Okres	Počet		<i>Coxiella burnetii</i>												Pozitívnych	
	lokalít	zvierat	1 : 8		1 : 16		1 : 32		1 : 64		1 : 128		1 : 256		počet	
			MAR	KFR	MAR	KFR	MAR	KFR	MAR	KFR	MAR	KFR	MAR	KFR	MAR	KFR
Jindřichův Hradec %	2	48	5 19,2	7 43,7	5 19,2	7 43,7	5 19,2	1 6,8	5 19,2	1 6,8	6 23,8	0 0			26 54,1	16 33,3
České Budějovice %	7	252	38 33,0	21 23,5	26 22,5	8 23,5	19 16,5	3 8,8	13 11,3	1 2,9	18 15,6	1 2,9	1 0,8	0 0	115 45,6	34 13,5
Strakonice %	5	144	21 38,1	7 46,8	12 21,8	5 33,3	10 18,1	2 13,3	4 7,2	1 6,6	8 14,5	0 0			55 38,2	15 10,4
Tábor %	5	180	24 22,0	25 58,1	28 25,6	10 23,2	19 17,4	5 11,6	7 6,4	2 4,6	25 22,9	1 2,3	6 5,5	0 0	109 60,5	43 23,8
Písek %	1	36	9 25,0	7 19,4	3 8,3	0 0	3 8,3	0 0	1 2,7	0 0	1 2,7	0 0			17 47,2	7 19,4
Prachatice %	2	72	8 53,3	2 22,2	1 6,6	5 55,5	3 20,0	2 22,2	1 6,6	0 0	2 13,3	0 0			15 20,8	9 12,5
Klatovy %	1	15	3 20,0	0 0	1 6,6	0 0									4 26,7	0 0
Spolu %	23	747	108 32,5	69 55,2	76 22,8	35 28,4	59 15,0	13 10,5	31 9,3	5 4,0	60 18,0	2 1,7	7 2,1	0 0	341 44,4	124 16,5

Zo všetkých vyšetrených kusov v 23 lokalitách je pozitívita *C. burnetii* pri MAR 44,4 % a pri KFR 16,5 % s tým, že takmer tretina zvierat má titer protilátok 1 : 8 pri MAR, ale až 55,2 % pri KFR. Najvyšší titer protilátok 1 : 256 je len pri MAR.

VOŠETRENIE HOVÄDZIEHO DOBYTKA NA PROTLÁTKY PROTI *CHL. PSITTACI* (TAB. I)

Vyšetrovanie hovädzieho dobytku na *Chl. psittaci* sa taktiež uskutočnilo v 23 lokalitách. Pozitívita sa zaznamenala v 18 lokalitách, avšak v piatich lokalitách bola iba u jedného z vyšetrovaných zvierat.

Najpreukaznejšia pozitívita je v okrese České Budějovice — 12,0 % (32 kusov v šiestich poľnohospodárskych závodoch) a v okrese Prachatic — 13,8 % (päť kusov v dvoch poľnohospodárskych závodoch). Pozornosť si zasluhuje skutočnosť, že zo siedmich poľnohospodárskych závodov v okrese České Budějovice je v šiestich lokalitách pozitívita *Chl. psittaci* v rozpätí 5,6 až 30,6 % u 32 kusov pozitívnych zvierat. U 24 kusov zvierat bol titer protilátok 1 : 8, u siedmich zvierat 1 : 16 a u jedného zvierata 1 : 32. Je to však aj 60,4 % pozitívnych zvierat na *Chl. psittaci* z tejto skúmanej vzorky 23 poľnohospodárskych závodov v siedmich okresoch.

Sedem pozitívnych zvierat je v troch lokalitách okresu Strakonice (dve negatívne), lenže v jednom (Slaník) je 13,9% pozitívita (päť zvierat) a v dvoch lokalitách je po jednom pozitívnom zvierati (2,8 až 4,2 %), všetky titre protilátok 1 : 8.

Rovnaký počet pozitívnych zvierat je aj v štyroch poľnohospodárskych závodoch okresu Tábor (jedna lokalita negatívna), z ktorých v troch lokalitách sú vždy dve pozitívne zvieratá. V dvoch lokalitách sú titre protilátok 1 : 8 a 1 : 16, v jednej lokalite 1 : 8, v jednej lokalite je jedno pozitívne zviera s titrom 1 : 16.

V oboch vyšetrovaných závodoch okresu Prachatic je celkom päť pozitívnych zvierat s titrami protilátok 1 : 8 (tri kusy) a 1 : 16 (dva kusy) pri výslednom percente pozitivity *Chl. psittaci* 5,6 až 8,3 %.

Jedno pozitívne zviera (titer protilátok 1 : 8) je v jednom vyšetrovanom poľnohospodárskom závode okresu Písek (2,8 %). Ten istý výpočet (titer 1 : 16) je aj v jednom z dvoch vyšetrovaných závodov okresu Jindřichův Hradec (2,08 %).

Celkove v 23 lokalitách siedmich okresov bolo 53 pozitívnych zvierat na protilátky *Chl. psittaci* z vyšetrených zvierat (7,1 %), ibaže rozpätie titrov bolo 1 : 8 (73,6 %), 1 : 16 (24,5 %) a 1 : 32 (1,8 %).

DISKUSIA

Podľa uznesenia predsedníctva vlády ČSSR č. 1/78 je potrebné náročnejšie tempo zvyšovania početných stavov hovädzieho dobytku zabezpečiť diferencovane, predovšetkým v tých oblastiach, v ktorých doterajšia intenzita ne zodpovedá možnostiam v zdrojoch základných krmív. Tento smer rozvoja sa má podporiť jednak zvýšenou výstavbou, jednak presunmi chovného a zástavbového hovädzieho dobytku medzi oblasťami a republikami. Spomedzi krajov Stredoslovenský, Východoslovenský, Severočeský sa ráta aj s oblasťou Šumavy (K ř e č e k, 1981). Z chovateľ-

ského i zdravotného hľadiska je pasienkový odchov mladého hovädzieho dobytká základným opatrením pre zvyšovanie úžitkovosti a ozdravenie hovädzieho dobytká.

Karássek a Dvořáček (1963) zdôrazňujú, že pastva na čerstvom vzduchu a slnku má priaznivý vplyv na pohlavnú činnosť mladého hovädzieho dobytká a prispieva k jeho väčšej odolnosti voči infekčným chorobám.

Oba uvádzané trendy sa uplatňujú aj v chovoch hovädzieho dobytká v južných Čechách. Majú však aj svoje negatíva. Najsamprv je to problematika presunov zvierat, pokiaľ ide o naše predchádzajúce výsledky z oblasti CHKO Šumava. Do CHKO sa na pasienkový odchov presúvali jalovice z južnej Moravy infikované koxiellou (Řeháček a i., 1987). Ukázalo sa, že šírenie infekcie touto cestou je reálne. Naše súčasné výsledky premorenia chovov hovädzieho dobytká *C. burnetii* v rôznych okresoch Juhočeského kraja presviedčajú, že zrušenie uzavretých obrátov stád hovädzieho dobytká vedie pozvoľna k prenikaniu tejto infekcie takmer do všetkých chovov v skúmanej oblasti. Nie neprávom upozorňujú Řeháček a i. (1987), že podstata nebezpečenstva šírenia infekcie spočíva v prenose agens presunom zvierat z oblastí známych výskytom Q horúčky. V tomto prípade sa žiada doplniť konštatovanie o skutočnosť: nebezpečenstvo je v dovoze zvierat, pri ktorom neboli doriešené všetky náležitosti veterinárnej starostlivosti.

Zvláštnou kapitolou výsledkov sú sérologické vyšetrenia na chlamýdie. Zistili sme ich výskyt a stretli sme sa s nízkymi titrami protilátok u hovädzieho dobytká.

Otáznym zostáva, prečo sa chlamýdie niekedy uplatňujú ako patogén a v iných súvislostiach to nie je tak. Širokú škálu symptómov ochorení spôsobených *Chl. psittaci* u hovädzieho dobytká uvádzajú Řeháček a i. (1987). Sáddecký (1981) pripúšťa, že človek sa infikuje chlamýdiami od hovädzieho dobytká iba príležitostne. Infekcia vtáčimi chlamýdiami je však pomerne častá. Ukazuje sa, že priame nebezpečenstvo jestvuje v chovoch, ktoré sú chlamýdiami infikované. Pôvodca sa vyskytuje najmä v črevách novorodených teliat. Pri potratoch i pôrodoch sú chlamýdie masívne vylučované do prostredia.

Doteraz sa zodpovedne neriešila problematika *Chl. psittaci* ako pôvodcu rôznych ochorení hovädzieho dobytká chovaného v južných Čechách. Preukázala sa však ich etiológia pri keratokonjunktivitídach teliat na Šumave (Cempírková a i., 1986). V tomto smere bude žiadúce konfrontovať výsledky našich vyšetrení z rokov 1986 až 1987 s problematikou symptomatológie vo vzťahu k etiológii. V žiadnom prípade nie je prijateľné, aby sa naše výsledky považovali len za prosté konštatovanie prítomnosti chlamýdií v skúmanej oblasti. Naším úmyslom bolo upozorniť na výskyt chlamýdií v terénnych podmienkach. Ak by sa u hovädzieho dobytká vykazujúceho symptómy podobné ochoreniam chlamýdiami preukázali, nie je nepodstatné, či *Chl. psittaci* je ich pôvodcom alebo nie. Má to totiž zásadný význam pre ich odstránenie, prípadne pre ich ďalšie šírenie.

Nasledujúce práce predpokladajú riešenie problematiky séropozitivity zvierat na *C. burnetii* a *Chl. psittaci* vo vzťahu k reprodukcií zvierat. Ako u *C. burnetii*, tak aj v prípade *Chl. psittaci* je dopad agens v našich podmienkach viac menej nejasný. Musíme pripustiť, že séropoziti-

vita hovädzieho dobytku na *C. burnetii* a *Chl. psittacci* v sledovanej oblasti pravdepodobne nie je odrazom manifestného priebehu ochorenia, alebo to nie je výrazne preukázané. Do určitej miery však je avízom pre možné vzplanutie Q horúčky predovšetkým u zamestnancov poľnohospodárskych závodov.

Na základe pozorovaní uzatvárame: autenticita infekcie *C. burnetii* je jav, ktorý sa musí brať do úvahy. Už pri podozrení na infekciu je nevyhnutná presná diagnostika. Zakladá sa na sérologickom vyšetrení (metóda aglutinácie, reakcie väzby komplementu, imunofluorescencia, ELISA), prípadne priamym nálezom pôvodcu najmä v mlieku a placentе domácich zvierat (izolácia *C. burnetii* na morčatách, alebo detekcia pôvodcu na náteroch z placentárneho tkaniva).

Literatúra

- CEMPÍRKOVÁ, R. — LISÁK, V. — ŘEHÁČEK, J. — SÁDECKÝ, E. — VOŠTA, J.: Etiologické aspekty infekční keratokonjunktivitidy skotu. In: Sbor. AF České Budějovice VŠZ v Praze. Praha 1986.
- KARÁSEK, V. — DVOŘÁČEK, M.: Živočišná výroba. Praha, Státní zemědělské nakladatelství 1963. 315 s.
- KŘEČEK, J.: Chov skotu. Praha, Státní zemědělské nakladatelství 1981, s. 24.
- ŘEHÁČEK, J. — VOŠTA, J. — TARASEVICH, I. V. — BREZINA, R. — JABLONSKAJA, V. A. — PLOTNIKOVA, L. F. — FETISOVA, N. F. — HANÁK, P.: Rickettsiose studies. 3. Natural foci of rickettsioses in South Bohemia. Bull. WHO, 55, 1977, s. 455-461.
- ŘEHÁČEK, J. — VOŠTA, J. — KOCIANOVÁ, E. — LISÁK, V. — HANÁK, P. — KOVÁČOVÁ, E. — CEMPÍRKOVÁ, R.: Výskyt koxielly na Šumavě. Veter. Med. (Praha), 32, 1987, s. 279-288.
- SÁDECKÝ, E.: Infection of cattle and livestock handlers with *Coxiella burnetii* and *Chlamydia psittaci* in the farm of Bernolákovo. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 25, 1981, s. 52-59.

Došlo dňa 14. 9. 1988

LISÁK, V. — VOŠTA, J. — ŘEHÁČEK, J. (Биовета, нац. предпр. Нитра; Сельскохозяйственный институт, Чешске Будейовице; Вирологический институт САН, Братислава): *Наличие Coxiella burnetii и Chlamydia psittaci у крупного рогатого скота в южной Чехии.* Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 403-410.

В 1986 и 1987 гг. в шести районах и 22 местах южночешской области и в одном районе и одном месте западночешской области обследовали методом микроагглютинации (MAR) и методом связи комплемента (KFR) с антителами против *Coxiella burnetii* и *Chlamydia psittaci* всего 747 голов скота. Позитивность к *C. burnetii* была у MAR 44,4% и при KFR 16,5%. Позитивность к *Chl. psittaci* составляла 7,1%. Особенно примечательным является значительное расширение и высокая позитивность коксиеллы в исследуемой области. Этот факт — ввиду упразднения закрытого оборота разведения крупного рогатого скота у нас — можно считать потенциальной опасностью при вспышке Q горячки у людей не только в южночешской области, но и в других местах.

метод микроагглютинации (MAR); место связи комплемента (KFR); Q горячка; антитела

LISÁK, V. — VOŠTA, J. — ŘEHÁČEK, J. (Biovet National Corporation, Nitra; University of Agriculture, České Budějovice; Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava): *The Incidence of Coxiella burnetii and Chlamydia psittaci in Cattle Reared in Southern Bohemia.* Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 403-410.

In 1986 and 1987 in six districts and 22 localities of the Southern Bohemian region, and in one district and one locality of the Western Bohemian region the total of

747 head of cattle was examined by a microagglutination method (MAR) and complement fixation method (KFR) for antibodies to *Coxiella burnetii* and *Chlamydia psittaci*. The positivity of *C. burnetii* detection was 44.4 % in MAR and 16.5 % in KFR. The positivity of *Chl. psittaci* detection was 7.1 %. The widespread incidence and highly positive results of coxiellosis findings in the given regions are especially remarkable. This circumstance — for the closed herd turnover in this country has been abandoned — can be considered a potential risk of Q fever outbreak in the human population not only in the Southern Bohemian region, but also in other localities.

microagglutination method (MAR); complement-fixation method (KFR); Q fever; antibodies

LISÁK, V. — VOŠTA, J. — ŘEHÁČEK, J. (Bioveta, volkseigener Betrieb, Nitra; Landwirtschaftliche Hochschule, České Budějovice; Virologisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Bratislava): *Vorkommen von Coxiella burnetii und Chlamydia psittaci bei Rindern in Südböhmen*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 403-410.

In den Jahren 1986 und 1987 wurden in sechs Kreisen und 22 Lokalitäten des Bezirks Südböhmen und in einem Kreis und einer Lokalität des Bezirks Westböhmen insgesamt 747 Stück Rinder auf Antikörper gegen *Coxiella burnetii* und *Chlamydia psittaci* u. zw. mittels der Methoden der Mikroagglutination (MAR) und der Komplementbindungsreaktion (KFR), untersucht. Die Positivität auf *C. burnetii* war bei MAR 44,4 % und bei KFR 16,5 %. Die Positivität auf *Chl. psittaci* war 7,1 %. Besonders beachtenwert ist die beträchtliche Verbreitung und die hohe Positivität der Koxiellose im untersuchten Territorium. Diese Tatsache ist — im Hinblick auf die Aufhebung des geschlossenen Umtriebs der Rinderherden bei uns — als eine potentielle Gefahr eines Aufflammens des Q-Fiebers bei Menschen und dies nicht nur im Bezirk Südböhmen sondern auch anderswo, zu betrachten.

Mikroagglutinationsmethode (MAR); Methode der Komplementbindungsreaktion (KRF); Q-Fieber; Antikörper

Adresy autorov:

MVDr. Vojtech Lisák, Bioveta, n. p., 949 91 Nitra

Doc. RNDr. PhMr. Jaroslav Vošta, CSc., Vysoká škola zemědělská Praha, agronomická fakulta, 370 05 České Budějovice

RNDr. Josef Řeháček, DrSc., Virologický ústav SAV, 817 03 Bratislava

V. Míčková, J. Lukášová, S. Konečný

MÍČKOVÁ, V. — LUKÁŠOVÁ, J. — KONEČNÝ, S. (Státní veterinární ústav, Ostrava; Vysoká škola veterinární, Brno): *Pseudomonas aeruginosa v syrovém a pasterovaném mléce*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 411-419.

Během jednoho roku jsme z 203 vzorků syrového mléka izolovali 18 kmenů *Pseudomonas aeruginosa*, tj. 8,87 %. Z 50 vzorků pasterovaného mléka jsme izolovali dva kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, tj. 4 %. Kmeny byly zachyceny pomnožovací technikou v maso-peptonovém bujónu (MPB) s malachitovou zelení a v selektivních médiích — centrimidovém agaru (CEM) a *Pseudomonas* F agaru. Všechny izolované kmeny produkovaly proteázu, lipázu produkovalo jen pět kmenů. Byly devitalizovány pasterační teplotou (72 °C) působící po dobu 20 sekund. Při chladiřenské teplotě (4 °C) se buňky kmenů pomnožovaly v průměru o dva řády, inhibiční účinek nízké teploty byl zjištěn pouze u jednoho kmene. Byl prokázán inhibiční účinek mléčných kultur (smetanové, jogurtové) na *Pseudomonas aeruginosa*; tento účinek se výrazněji projevil při teplotě 4 °C. Izolované kmeny byly výrazně citlivé ke gentamycinu.

Pseudomonas aeruginosa v mléce; frekvence výskytu; kultivace; typizace; citlivost na antibiotika

Stále častěji se setkáváme s epidemiologickými údaji o podmíněné patogenitě gramnegativních nefermentujících mikroorganismů, které jsou příčinou vzniku alimentárních nákaz. Klinické symptomy nevyvolávají jen samotné mikroorganismy, ale i produkty jejich metabolismu, jakož i rozkladné produkty složek potravin, které jsou výsledkem biologické aktivity těchto mikrobů a které se mohou nepříznivě uplatnit nejen v lidském organismu, ale i v kontaminovaných potravinách, zejména v syrovém mléce.

Literárních údajů o otravách z potravin vyvolaných *Pseudomonas aeruginosa* je poměrně málo a většinou se týkají novorozenců a kojenců (Burzynska a Maciejša, 1974; Ormay aj., 1980; Jedličková, 1982).

Katona a Lanyi (1982) referují o výskytu *Pseudomonas aeruginosa* v syrovém mléce u 56 % vzorků a uvádějí jejich výskyt do souvislosti s nedostatečnou hygienou při získávání mléka. Kielwein (1986) izoloval 6,7 % kmenů *Pseudomonas aeruginosa* ze syrového mléka. Otte aj. (1978) získali *Pseudomonas aeruginosa* ze 37 % vzorků mléka Haladová a Lancová (1979) izolovaly 40 % *Pseudomonas aeruginosa* z konzumního pasterovaného mléka.

Vlivem některých technologií na přežívání *Pseudomonas aeruginosa* v potravinách se zabývali Lukášová a Mráz (1986) a zjistili, že

pasterační teploty inhibují jejich růst, mléčné kysání pouze redukuje počty buněk tohoto zárodku.

Inhibicí růstu podmíněně patogenních kmenů včetně *Pseudomonas aeruginosa* ve fermentovaných mléčných výrobcích se zabýval K o n e č n ý (1986) a potvrdil vysokou inhibiční účinnost acidofilního mléka a jogurtu, zvláště při teplotě 22 °C.

Smyslem našeho sledování bylo zjistit frekvenci bakterií *Pseudomonas aeruginosa* v syrovém a pasterovaném mléce, ověřit vhodnou metodiku zachytu, selektivní diagnostická média a prověřit vlastnosti izolovaných kmenů vzhledem k jejich dalšímu působení v potravině (tj. proteolytická a lipolytická aktivita, odolnost vůči pasterační a chladiřenské teplotě, mléčnému kysání a citlivost k antibiotikům).

MATERIÁL A METODY

Předmětem vyšetření byly 203 vzorky syrového mléka a 50 vzorků mléka pasterovaného v obchodním balení. Všechny vzorky mléka byly inokulovány v množství 10 ml do 10 ml maso-peptonového bujónu (MPB) s malachitovou zelení v koncentraci 1:100 000 (Schubert aj., 1973) a inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Z tohoto média jsme vyočkovávali na centrimidový agar (Merck) a *Pseudomonas* F agar (Imuna) jako na půdy selektivní a na Endovu půdu. Endovu půdu jsme použili i pro přímý nátěr sedimentu mléka (podle ČSN 56 0100).

Centrimidový agar byl inkubován 48 hodin při teplotě 37 °C (Goto a Enomoto, 1970; Lilly a Lowbury, 1972), *Pseudomonas* F agar byl inkubován při teplotě 22 °C po dobu tří až pěti dnů, porost byl prohlížen v UV světle (Lysenko, 1961; Zahradnický, 1979) a bylo sledováno žlutozelené zabarvení.

Jako diagnostické testy pro rod *Pseudomonas* jsme používali:

1. cytochromoxidázu (Daubner a Mayer, 1968);
2. růst při teplotě 42 °C na šikmém TGYE agaru po jednodenní inkubaci (Duben, 1977);
3. tvorba amoniaku v acetamidovém médiu s 0,1 % acetamidu (Bühlmanna aj., 1961). Pozitivní reakce — vznik oranžově červené sraženiny — byla prokazována Nesslerovým činidlem po jednodenní inkubaci;
4. tvorba dihydrolázy argininu v Moellerově médiu (Moeller, 1955);
5. pohyb v agaru s TTC;
- 6., 7. tvorba lyzín- a ornithindekarboxyláz v Moellerově médiu (Moeller, 1955);
8. tvorba indolu;
9. tvorba sirovodíku v Hajnově médiu;
10. průkaz DNAzy na půdě DNA Oxoid (OXOID Manual, 1982).

Jako diferenciacně diagnostické testy pro *Pseudomonas aeruginosa* jsme brali v úvahu:

1. rychlou tvorbu argininu;
2. růst na CEM agaru (žlutozelená zóna kolem kolonií);
3. růst na *Pseudomonas* F agaru (hnědozelený porost a pozorování žlutozeleného pigmentu v UV světle);
4. růst při teplotě 42 °C na TGYE agaru (tryptóno-glukózový kvasničný agar);
5. aglutinace s komerčně vyráběnými O-antiséry *Pseudomonas aeruginosa* SEVAC, a to PsOA, PsOB, PsOC (Toršová aj., 1984).

Ke sklíčkovému aglutinačnímu testu jsme používali čerstvé bakteriální kultury vyrostlé na centrimidovém agaru. Pozitivní reakce byly hodnoceny nejdéle do jedné minuty. Biochemická aktivita byla hodnocena s použitím schematu, které uvedl Gilar di (1977).

U izolovaných kmenů byly zjišťovány tyto další vlastnosti:

PROTEOLYTICKÁ A LIPOLYTICKÁ AKTIVITA

Proteolytickou a lipolytickou aktivitu jsme zjišťovali na MPA s želatínou a Tweenem 80 (Guthierrez a Gonzales, 1972), inkubace trvala 24 až 48 hodin při teplotě 30 °C. Po posouzení lipolytické aktivity (mléčné zkalená zóna kolem kolonií) jsme porost přelili roztokem chloridu rtuťnatého a posuzovali jsme proteolytickou aktivitu (zóna projasnění kolem kolonií).

VLIV CHLADÍRENSKÉ TEPLOTY

Suspenzi vyšetřovaných kmenů v množství 0,1 ml jsme naočkovali do 10 ml MPB a stanovili jsme počáteční koncentraci. Zkumavky byly skladovány čtyři týdny při teplotě 4 °C. Každý týden jsme odebrali vzorek a stanovili jsme počet kolonií *Pseudomonas aeruginosa* plotnovou metodou.

VLIV PASTERAČNÍ TEPLOTY

Ke kultivaci kmenů jsme použili rekonstituované polotučné mléko a MPB. Vzorky byly zahřáty na teplotu 72 °C na dobu 20 sekund. Pak byly rychle zchlazeny a byl stanoven počet buněk *Pseudomonas aeruginosa*.

VLIV MLÉČNÉHO KYSÁNÍ

100% odtučněné mléko jsme po obnovení rozplnili po 50 ml, zahřáli na teplotu 85 °C 10 minut a potom zchladili na teplotu 45 °C. K mléku jsme přidali 2 ml jogurtové kultury RX (ředěné mlékem 1 : 1) a suspenzi kmenů *Pseudomonas aeruginosa*. Mléko bylo inkubováno v termostatu při teplotě 43 °C po dobu 3,5 hodiny. Po této době byla stanovena titrační kyselost použitím chloridu sodného ($c=0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a počet buněk *Pseudomonas aeruginosa*. Vzorky byly dále skladovány 24 hodiny při chladničkové teplotě a v nich byly stanoveny stejné hodnoty.

Tentýž postup byl zachován při použití smetanové kultury. Vzorky byly zchlazeny na teplotu 23 °C a po naočkování inkubovány 24 hodiny při teplotě 22 °C.

Ke stanovení počtu *Pseudomonas aeruginosa* byla použita kvantitativní plotnová metoda na *Pseudomonas* F agar. U všech vzorků byla vždy stanovena počáteční koncentrace *Pseudomonas aeruginosa* ($10^7 - 10^8 \cdot \text{ml}^{-1}$).

CITLIVOST K VYBRANÝM ANTIBIOTIKŮM

Citlivost k vybraným antibiotikům jsme stanovili difúzní diskovou metodou na Mueller-Hintonově agaru (Výmola a Hejzlar, 1964) za použití disků Lachema s obsahem tohoto množství účinné látky: gentamicin (20 µm), streptomycin (30 µg), neomycin (30 µg), kolistin (50 µg), tetracyklin (30 µg), vankomycin (30 µg), penicilin (10 m. j.).

VÝSLEDKY

Ve sledovaném období jsme na zárodky rodu *Pseudomonas* vyšetřili 203 vzorky syrového mléka a izolovali jsme 18 kmenů *Pseudomonas aeruginosa*, tj. 8,87 % z celkového počtu vyšetření. Dále bylo vyšetřeno 50 vzorků pasterovaného mléka v obchodním balení a byly izolovány dva kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, tj. 4,0 %. Jako *Pseudomonas aeruginosa* byly určeny kmeny, které vytvářely žlutozelenou zónu na CEM agaru, rostly při teplotě 42 °C, hydrolyzovaly arginin, vytvářely žlutozelený pigment na pseudomonádovém F agaru, byly negativní v testech štěpení lyzinu, ornithinu, tvorby indolu a sirovořidku. 16 kmenů bylo pohyblivých, pouze dva vykazovaly negativní pohyb. Jeden kmen tvořil deoxyribonukleázu (tab. I).

Přímou kultivací ze sedimentu mléka na Endovu půdu nebyl zachycen ani jeden kmen rodu *Pseudomonas*.

Vzorek	Počet izolovaných kmenů	Cytochromoxidáza		Růst při teplotě 42 °C		Štěpení acetaldehydu		Cetrimidový agar		Pyoverdinin		Arginin dihydroláza	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Syrové mléko	18	18		18		18		18		18		18	
Pasterované mléko	2	2		2		2		2		2		2	

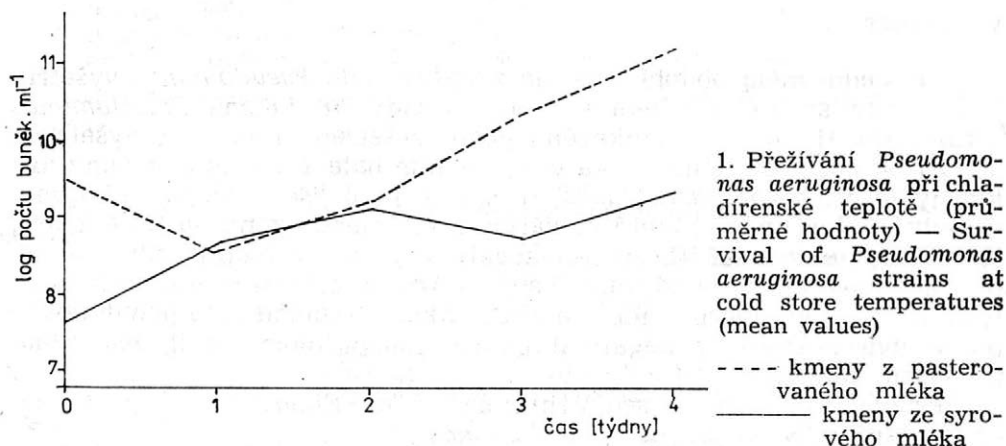
Na Endově půdě po pomnožení v MPB s malachitovou zelení bylo z materiálu izolováno osm kmenů *E. coli*, tři kmeny *Pseudomonas species* a po jednom kmeni *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas cepacia*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter anitratus* a *Providentia rettgeri*. Tyto kmeny nebyly předmětem dalšího studia.

Všechny izolované kmeny *Pseudomonas aeruginosa* produkovaly proteázu, lipázu produkovalo jen pět kmenů.

Z vybraných antibiotik byly všechny kmeny silně citlivé ke gentamycinu, sedm kmenů ke streptomycinu. Slabě citlivých bylo jedenáct kmenů ke streptomycinu a deset kmenů k neomycinu. Rezistentní byly dva kmeny ke streptomycinu, deset kmenů k neomycinu. Všech 20 kmenů bylo rezistentních ke kolistinu, tetracyklinu, vankomycinu a penicilinu.

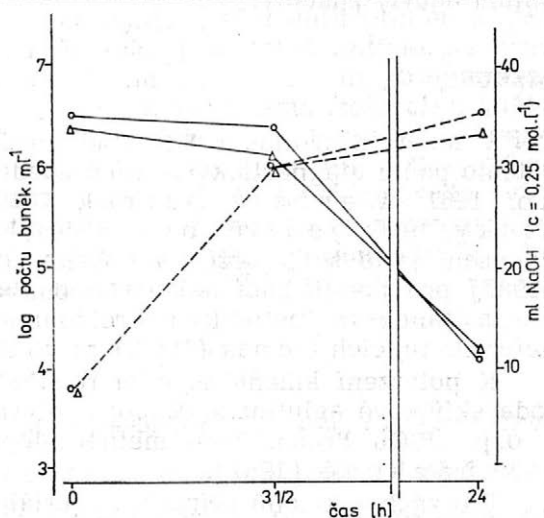
Pasterační teplota 72 °C po dobu 20 sekund způsobila devitalizaci všech použitých kmenů *Pseudomonas aeruginosa*, a to jak v MPB, tak v mléce.

Při skladování bujónových kultur izolovaných kmenů při chladírenské teplotě (4 °C) po dobu čtyř týdnů se počet buněk zvýšil v průměru



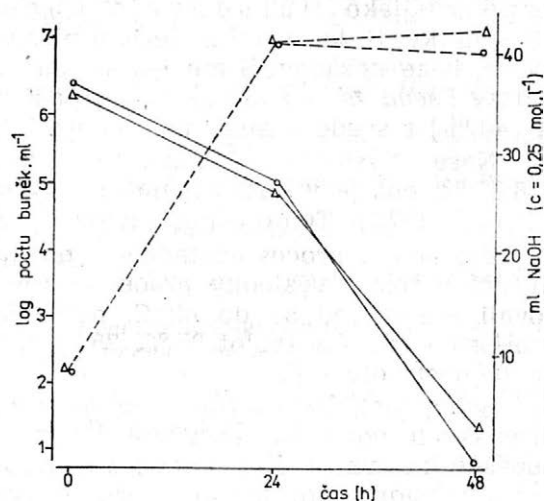
Ornithin dekarboxyláza		Lyzin dekarboxyláza		Pohyb		Indol		H ₂ S		Deoxyribonukleáza		Agglutinace s O-séry		Produkce lipáz		Produkce proteáz	
+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	18		18	16	2		18		18	1	17	18		5	13	18	
	2		2	2			2		2		2	2			2	2	

2. Vliv jogurtové kultury na *Pseudomonas aeruginosa* — The influence of yogurt culture on *Pseudomonas aeruginosa* strains



3. Vliv smetanové kultury na *Pseudomonas aeruginosa* — The influence of cream culture on *Pseudomonas aeruginosa* strains

- *P. aeruginosa* (pasterované mléko)
- △—△ *P. aeruginosa* (syrové mléko)
- titrační kyselost (pasterované mléko)
- △---△ titrační kyselost (syrové mléko)



o dva řády. Rozdíl mezi kmeny izolovanými ze syrového a pasterovaného mléka nebyl zjištěn (obr. 1). Z vyšetřovaných kmenů byl pouze u jednoho zaznamenán inhibiční účinek nízké teploty.

Mléčné kysání — aktivita jogurtové kultury v mléce se projevila zvýšením titrační kyselosti ze 7,0 ml na 30,1 ml NaOH ($c=0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) po 24hodinovém skladování vzorků při teplotě 4 °C. Se stoupající kyselostí klesal počet buněk *Pseudomonas aeruginosa* z původní hodnoty $3,6 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ na $1,7 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ po 3,5 hodině a po 24 hodinách na $2 \cdot 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$ (obr. 2).

Při použití smetanové kultury byly výsledky obdobné, vzhledem k delší době inkubace však byla titrační kyselost vyšší a počet buněk *Pseudomonas aeruginosa* nižší (obr. 3). Rozdíl mezi kmeny izolovanými ze syrového a pasterovaného mléka nebyly zjištěny.

Kmeny *Pseudomonas aeruginosa* po působení chladírenské teploty, jogurtové a smetanové kultury byly znovu vyšetřeny na produkci lipázy, proteázy a na citlivost k antibiotikům. Změny proti původním hodnotám nebyly zjištěny.

DISKUSE

V laboratorní diagnostice pseudomonád je možné postupovat podle většího počtu diagnostických klíčů uvedených různými autory (Lysenko, 1961; Wahbe a Darrel, 1965; Baštář, 1975; Zahradnický, 1979; Jedličková, 1980; Juřeníková, 1982). Pro zjednodušení jsme se přidržovali návrhu, který podala Klokochníková (1987) pro identifikaci některých bakteriálních druhů rodu *Pseudomonas*, a standardní metodiky mikrobiologické diagnostiky gramnegativních nefermentujících tyčinek (Duben, 1977).

K potvrzení kmenů se nám rovněž plně osvědčila jednoduchá metoda sklíčkové aglutinace pomocí polyvalentních anti-O sér, vyráběných v o. p. ÚSOL Praha. Tuto metodu doporučují Toršová aj. (1984) a Beňáčeková (1987).

Pro záchyt kmenů přímo z materiálu — mléka — jsme získali tytéž zkušenosti jako Haladová a Lacová (1979), že bez pomnožovací techniky, tj. kultivací materiálu přímo na Endovu půdu (ČSN 56 0100, 1970), jsme nezachytili ani jeden kmen *Pseudomonas aeruginosa*. Jejich nálezy *Pseudomonas aeruginosa* z pasterovaného mléka byly ovšem vyšší (40 %) a svědčily spíše pro sekundární kontaminaci.

Naše výsledky dokumentují záchyt *Pseudomonas aeruginosa* v 8,87 %, což je v korelaci např. s výsledky, ke kterým dospěl Kielwein (1970). Tento autor izoloval 6,7 % kmenů ze syrového mléka.

Pasterační proces dostačuje k devitalizaci *Pseudomonas aeruginosa*. Svědčí o tom i výsledky práce autorů Otte aj. (1978), kteří prověřovali teploty od 55 do 80 °C, nebo Lukášová a Mráz (1986), kteří zkoušeli vliv teplot 65 °C, 75 °C a 85 °C. Rovněž naše výsledky tuto skutečnost potvrzují.

Schopnost *Pseudomonas aeruginosa* přežívat a množit se při chladírenských teplotách potvrzují i autoři Higushi aj. (1975), kteří úspěšně kultivovali *Pseudomonas aeruginosa* při teplotě 5 až 7 °C, i když je *Pseudomonas* považován za druh typicky mezofilní.

Proteolytické a lipolytické vlastnosti jsou prokazovány u většiny pseudomonád. Zjistili jsme je i my u izolovaných kmenů, ale vzhledem k malému výskytu v mléce nemají z hlediska technologického význam.

O přežívání *Pseudomonas aeruginosa* ve fermentovaných mléčných výrobcích existuje velmi málo údajů. Zůstává nevyjasněno, zda redukci těchto mikroorganismů způsobuje vysoká kyselost nebo antimikrobní aktivita mléčných bakterií (Pulugani aj., 1979). Kafel aj. (1981) zkoušeli vliv různého pH v mléce na přežívání *Pseudomonas aeruginosa* za různých teplot skladování. Zjistili, že se nerozmnožuje při pH 4,5.

V naší práci jsme prokázali inhibiční účinek mléčných kultur na *Pseudomonas aeruginosa*. Výraznější byl u smetanové kultury, kdy se již během zrání snížil počet mikroorganismů. V průběhu jogurtového zrání nebyl větší pokles buněk zaznamenán. Teprve skladováním vzorků při chladničkové teplotě se výrazně projevil inhibiční účinek mléčných kultur. Rovněž Konečný (1986) potvrdil inhibiční účinnost fermentovaných mléčných výrobků na *Pseudomonas aeruginosa*, zvláště při skladování při teplotě 4 °C.

Odolnost kmenů *Pseudomonas aeruginosa* vůči antibiotikům je známa zvláště v nemocničním prostředí. Jako použitelná antibiotika uvádí Jedličková (1980) karbenicilin, polymyxin B, kolistin, streptomycin, neomycin a především gentamycin. Kmeny, které jsme izolovali z mléka, byly rovněž citlivé na gentamycin, 50 % jich bylo citlivých na streptomycin. Ostatní antibiotika měla malou citlivost. Zschücker a Schliesser (1986) použili k vyšetření 146 kmenů původu zvířecího a 50 kmenů původu lidského. Všechny kmeny byly rezistentní vůči penicilinu. Kmeny zvířecího původu byly citlivé na gentamycin a kolistin, kmeny lidského původu na gentamycin v 10 %.

Literatura

- BAŠTÁŘ, M.: Problematika kmenů rodu *Pseudomonas*. In: Sbor. věd. Prací ÚSVÚ, 5, 1975, s. 83-91.
- BENÁČKOVÁ, E.: Sérologická typizace *Pseudomonas aeruginosa* antiséry SEVAC, Zprávy SEVAC, 2, 1987, s. 53-57.
- BÜHLMANN, Y. — VISCHER, W. A. — BRUHIN, K.: Die Identifizierung nicht Pyocyanin-Bilden der Stämme von *Pseudomonas aeruginosa*. Zbl. Bakt., Orig., 183, 1961, s. 369-380.
- BURZYŃSKA, H. — MACIEJSKA, K.: Wstepne rozpoznanie występowania *Pseudomonas aeruginosa* w srodkach spożywczych. Roczn. Państw. Zakł. Hig., 25, 1974, s. 641-647.
- ČSN 56 0100. Mikrobiologické zkoušení poživatin, předmětů běžného užívání, prostředí potravinářských provozoven. 1970.
- DAUBNER, L. — MAYER, J.: Die Anwendung der Oxydasetests bei der Wasseranalyse. Arch. Hyg., 152, 1968, s. 302-305.
- DUBEN, J.: Standardní metoda mikrobiologické diagnostiky a identifikace gram-negativních nefermentujících tyčinek. AHM, 2, 1977, 33 s.
- GILARDI, G. L.: Identification of nonfermentative gram negative bacteria (NFB). Účelová publikace. 1977. 7 s.
- GOTO, S. — ENOMOTO, S.: Nalidixic acid centrimide agar: a new selective plating medium for the selective isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. Jap. J. Microbiol., 14, 1970, s. 65.
- GUTHIEREZ, C. — GONZALES, C.: Method for simultaneous detection of proteinase and esterase activities in extremelly halophilic bacteria. Appl. Microbiol., 24, 1972, s. 516-517.
- HALADOVÁ, E. — LACOVÁ, M.: Výskyt *Pseudomonas aeruginosa* v pasterizovanom mlieku. Českoslov. Hyg., 24, 1979, s. 447-450.

- HIGUSHI, H. — HAMADA, S. — DOI, M.: Studies on the growth of psychrotrophic bacteria: growth at various incubation temperature of psychrotrophic *Pseudomonas* originated from raw milk and meat. Jap. J. veter. Sci., 37, 1975, s. 165-177.
- JEDLIČKOVÁ, Z.: *Pseudomonas aeruginosa* — identifikace a citlivost na chemoterapeutika. Sbor. Českoslov. Spol. mikrobiol., 1980, s. 11-12.
- JURENÍKOVÁ, V.: Diagnostika gramnegativních nefermentujících bakterií. Českoslov. Epidem. Mikrobiol. Imunol., 31, 1982, s. 38-47.
- KAFEL, S. — SZTEYN, J. — RADKOWSKI, M.: Wpływ roznych pH na przeżywalność *Pseudomonas aeruginosa* w mleku i homogenizacie miesnym w mleku i homogenizacie w zalesnosci od temperatury. Med. veter., XXXVII, 1981, s. 183-185.
- KATONA, F. — LANYI, B.: Hygienic aspects of presence of *Pseudomonas aeruginosa* in raw milk. XXIIth Internat. Dairy Congr., Moscow 1982.
- KIELWEIN, G.: *Pseudomonas aeruginosa*: Untersuchungen über das Vorkommen in Rohmilch und die bakteriologische Charakterisierung. Arch. Lebensmittelhyg., 19, 1968, s. 145-154.
- KIELWEIN, G.: Milchhygiene — auch eine wirtschaftliche Notwendigkeit. Alimenta, 1970, s. 39-45.
- KLOKOČNÍKOVÁ, L.: Pseudomonádové infekcie. Súborný referát. Českoslov. Epidem. Mikrobiol. Imunol., 31, 1982, s. 310-320.
- KONEČNÝ, S.: Inhibice růstu některých patogenních a podmíněně patogenních bakterií ve fermentovaných mléčných výrobcích. Prům. Potravn., 7, 1986, s. 427.91-427.93.
- LILLY, H. A. — LOWBURY, E. J.: Centrimide-nalidixic acid agar as a selective medium for *Pseudomonas aeruginosa*. J. med. Microbiol., 5, 1972, s. 151-153.
- LUKÁŠOVÁ, J. — MRÁZ, O.: Effects of some technological processes on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* in foods. Acta veter. (Brno), 55, 1986, s. 353-358.
- LYSENKO, O.: *Pseudomonas* — an attempt at a general classification. J. gen. Microbiol., 25, 1961, s. 379-468.
- MOELLER, V.: Simplified tests for some aminoacid decarboxylases and for the arginin dihydrolase system. Acta path. microbiol. scand., 36, 1955, s. 159-172.
- ORMAY, L. — JÁNOSSY, L. — TARJAN, R.: Supposed role of *Pseudomonas* in food poisoning. In: Sbor. Komise potravn. Mikrobiol., 1980, s. 45-51.
- OTTE, I. — HAHN, G. — TOLLE, A.: Vorkommen, Nachweis und Bedeutung von *Pseudomonas aeruginosa* in Rohmilch und in der Umgebung von Milchtieren. Milchwirtsch. Zbl., 33, 1978, s. 737-739.
- OXOID Manual, 1982, s. 122-123.
- PULUGANI, S. R. — RAC, D. R. — SUNPO, J.: Antimicrobial activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Str. thermophilus*. J. Fd Sci., 44, 1979, s. 575-578.
- SCHUBERT, R. H. W. — ESANU, J. G. — ESANU, F.: Ein vereinfachtes Schema zur Identifizierung der im Oberflächen- und Grundwasser vorkommenden *Pseudomonas*. Zbl. Bakt., Abt. I, Orig. B, 1973, s. 183-193.
- TORŠOVÁ, A. — KLOUDOVÁ, A. — GAWLAS, W.: Naše zkušenosti s typizací *Pseudomonas aeruginosa* pomocí typizačních sér Sevac. Českoslov. Epidem. Mikrobiol., 1984, s. 256-261.
- VÝMOLA, F. — HEJZLAR, M.: Difúzní disková metoda pro určování citlivosti mikrobů na antibiotika. Zpr. techn.-porad. Služby, Spolana, 6, 1964, s. 15-18.
- WAHBE, A. H. — DARREL, J. H.: The identification of atypical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. gen. Microbiol., 38, 1965, s. 329-342.
- ZAHRADNICKÝ, J.: Typizace *Pseudomonas aeruginosa* pomocí pyocianinů. Českoslov. Epidem. Mikrobiol. Imunol., 28, 1979, s. 276-284.
- ZSCHÜCK, M. — SCHLIESSER, T.: O-Serovare und Antibiotikoempfindlichkeiten bei Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* menschlicher und tierischer Herkunft. Zbl. veter. Med., 33, 1986, s. 440-446.

Došlo dne 22. 7. 1988

МИЧКОВА, В. — ЛУКАШОВА, Й. — КОНЕЧНЫ, С. (Государственный ветеринарный институт, Острава; Ветеринарный институт, Брно): *Pseudomonas aeruginosa* в сыром и пастеризованном молоке. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 411-419.

В течение одного года из 403 проб сырого молока мы изолировали 18 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, т. е. 8,87 %. Из 50 проб пастеризованного молока мы изоли-

ровали два штамма *Pseudomonas aeruginosa*, т. е. 4 %. Штаммы были открыты размноживающей техникой в мясопептонном бульоне (MPB) с малахитовой зеленой и в селективных средах — центримидном агаре (CEM) и *Pseudomonas* F агаре. Все изолированные штаммы производили протеазу, липазу же производили лишь пять штаммов. Они были лишены жизнеспособности путем пастеризованной температуры (72 °C) продолжительностью в 20 секунд. При морозильной температуре (4 °C) клетки штаммов размножались, в среднем, на два ряда, ингибирующее действие низкой температуры было установлено лишь у одного штамма. Было доказано ингибирующее действие молочных культур (сметанной, йогуртовой) на *Pseudomonas aeruginosa*; это действие проявилось более существенно при температуре 4 °C. Изолированные штаммы были существенно восприимчивы к гентамицину.

Pseudomonas aeruginosa в молоке; частота появления; культивация; типизация; переживание; чувствительность к антибиотикам

MÍČKOVÁ, V. — LUKÁŠOVÁ, J. — KONEČNÝ, S. (State Veterinary Institute, Ostrava; University of Veterinary Medicine, Brno): *Pseudomonas aeruginosa* in Raw and Pasteurized Milk. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 411-419.

Eighteen strains of *Pseudomonas aeruginosa*, i. e. 8.87 %, were isolated during a year from 203 samples of raw milk. Two *Pseudomonas aeruginosa* strains, i. e. 4 %, were isolated from 50 samples of pasteurized milk. The strains were isolated using propagation techniques in meat-peptone broth with malachite green and on selective media — on centrimide agar (CEM) and on *Pseudomonas* F agar. All the isolated strains produced protease, whereas lipase was produced by only five strains. The strains were devitalized when exposed to pasteurization temperatures (72 °C) for 20 seconds. At cold store temperatures (4 °C), *Pseudomonas aeruginosa* strain cells propagated on average by two orders, inhibitory effects of low temperatures were recorded only with one strain. Inhibitory effects of milk cultures (cream, yogurt) on *Pseudomonas aeruginosa* were observed; their effects were more clear-cut at the temperature of 4 °C. The strains were markedly susceptible to gentamycin.

Pseudomonas aeruginosa in milk; frequency of occurrence; cultivation; standardization; survival; susceptibility to antibiotics

MÍČKOVÁ, V. — LUKÁŠOVÁ, J. — KONEČNÝ, S. (Staatliches Veterinärinstitut, Ostrava; Landwirtschaftliche Hochschule, Brno): *Pseudomonas aeruginosa* in pasteurisierter und in Rohmilch. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 411-419.

Während eines Jahres isolierten wir aus 203 Rohmilchproben 18 Stämme *Pseudomonas aeruginosa*, d. h. 8,87 %. Aus 50 Proben der pasteurisierten Milch isolierten wir 2 Stämme *Pseudomonas aeruginosa*, d. h. 4 %. Die Stämme wurden mit Hilfe der Vermehrungstechnik im Fleischpeptonbouillon (MPB) mit Malachitgrün und in Selektivmedien — im Zentrimidagar (CEM) und im *Pseudomonas* F — Agar aufgefangen. Alle isolierten Stämme produzierten die Protease, nur 5 Stämme produzierten die Lipase. Sie wurden bei einer Temperatur von 72 °C (Pasteurisierungstemperatur) 20 Sekunden lang devitalisiert. Bei einer Kühlhaustemperatur von 4 °C wurden die Zellen der behandelten Stämme im Durchschnitt grössenordnungsmässig 2X vermehrt, eine inhibierende Wirkung der niedrigen Temperatur konnte nur bei einem Stamm nachgewiesen werden. Es konnte eine inhibierende Wirkung der Milchkulturen (Sahnen- Joghurtkulturen) auf *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden; diese Wirkung zeigte sich bedeutend bei einer Temperatur von 4 °C. Die isolierten Stämme wiesen eine grosse Empfindlichkeit gegen über Genta-mycin auf.

Pseudomonas aeruginosa in Milch; Vorkommensfrequenz; Kultivierung; Typisierung; Überleben; Empfindlichkeit gegen Antibiotika

Adresy autorů:

MVDr. Vlasta Míčková, MVDr. Stanislav Konečný, Státní veterinární ústav, 723 08 Ostrava-Martinov

MVDr. Jindra Lukášová, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

Upozorňujeme čtenáře, že do čísla 8 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

které je věnováno otázkám radiobiologie,
mají být zařazeny příspěvky:

- J. Hrušovský, M. Tokošová, P. Mižik: Kontaminácia potravín rádionuklidmi cézia
- J. Choma, J. Hajurka, J. Elečko, A. Jušíková: Rádioimunologické stanovenie progesterónu a rektálna palpácia ovárií pri embryonálnej mortalite kráv
- P. Mižik, J. Hrušovský, M. Tokošová: Vplyv prírodného zeolitu na vylučovanie a distribúciu rádiocézia u potkanov
- I. Maraček, A. Jušíková, V. Hendrichovský, E. Bekeová, M. Krajničáková: Koncentrácia progesterónu a estradiolu krvného séra vo vzťahu k terciárnym folikulom vaječníka oviec v proestre a po podaní gonadoliberínu
- J. Jandl, J. Novosad, J. Francová, H. Procházka: Odstraňování cesia z jeleního masa
- Ě. Bekeová, J. Elečko, V. Hendrichovský, J. Hajurka, J. Choma, M. Krajničáková: Zabrzávanie dojníc v rôznych ročných obdobiach vo vzťahu ku koncentrácii tyroxínu a trijódtyronínu
- H. Procházka, J. Jandl, V. Jirásek, J. Francoová, K. Sekera: Aspekty dlouhotrvající ingesce kontaminované potravy u hovězího dobytka a zvěře

NÁLEZY KYSELINY CYKLOPIAZONOVÉ A JEJÍCH PRODUCENTŮ V POŽIVATINÁCH

V. Ostrý, M. Polster

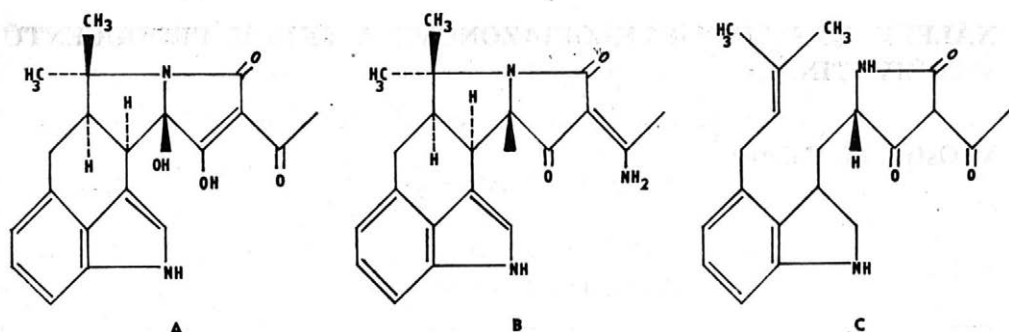
OSTRÝ, V. — POLSTER, M. (Centrum hygieny potravinových řetězců, Institut hygieny a epidemiologie, Brno): *Nálezy kyseliny cyklopiazonové a jejích producentů v poživatinách*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 421-430.

V průběhu šesti měsíců jsme vyšetřili 60 vzorků poživatin na obsah kyseliny cyklopiazonové. Vzorky jsme podrobili základnímu mykologickému průzkumu se zaměřením na kmeny *Aspergillus flavus* a *Penicillium* sp. Hodnoty kyseliny cyklopiazonové ve vzorcích sýrů Hermelín, arašídů, rýže, krup, salámu Poličan a baleného masa nepřesáhly ani u jednoho vzorku 0,5 mg . kg⁻¹. Modifikovanou metodou izolace kyseliny cyklopiazonové podle Dornera aj. (1983) jsme získali 521 mg tohoto mykotoxinu z kmene *Penicillium griseofulvum* CCM 8006 na tekuté půdě s 2 % kvasničného autolýzátu a 2,5 % sacharózy. 47 % izolovaných kmenů *Aspergillus flavus* bylo bitoxinogenních (produkovalo kyselinu cyklopiazonovou i aflatoxin). 23,5 % zachycených kmenů *Penicillium* sp. produkovalo kyselinu cyklopiazonovou. Sbírkové kmeny *Penicillium nalgoviensis* neprodukovaly *in vitro* na sladinkovém agaru se sójovým peptonem kyselinu cyklopiazonovou. Kmeny *Penicillium commune* F-426 a *Penicillium aurantiogriseum* F-708 jsou dobrými producenty této kyseliny.

přirozený výskyt; potraviny; mikromycety; bitoxinogenita; mykotoxiny

Kyselina cyklopiazonová (CPK) je mykotoxin střední toxicity, který se vyskytuje ve třech formách — alfa, beta a ve formě iminu (obr. 1). Jestliže budeme dále hovořit o kyselině cyklopiazonové (CPK), myslíme tím především formu α CPK, která je vzhledem ke své toxicitě z uvedených tří forem nejvýznamnější. CPK je produkována kmeny vláknitých mikromycet rodu *Penicillium* (*P. cyclopium*, *P. patulum*, *P. viridicatum*, *P. puberulum*, *P. crustosum*, *P. hirsutum*, *P. commune*, *P. cammemberti*). V poslední době byla zjištěna produkce u *Penicillium chrysogenum* (ze 123 testovaných kmenů byl jeden pozitivní na produkci CPK) a *Penicillium nalgoviensis* (ze 113 testovaných kmenů byl jeden pozitivní na produkci CPK) (El Banna aj., 1987).

CPK však produkují také zástupci rodu *Aspergillus* (*A. versicolor*, *A. oryzae*, *A. tamarii* a *A. flavus*). Vylučování tohoto mykotoxinu kmenem mikromycety *Aspergillus flavus* je důležité z hlediska jeho možné společné produkce s vysoce nebezpečnými aflatoxiny, jak uvádějí různé práce (Luk aj., 1977; Gallagher aj., 1978; Dorner aj., 1984; Polster aj., 1988). Dokonce bylo konstatováno, že bitoxinogenních kmenů *A. flavus*, tj. kmenů vylučujících společně CPK a aflatoxiny, je většina. Naskytá se tu možnost vzájemného ovlivňování obou mykotoxinů, ačkoliv v poslední práci (Morrissey aj., 1987) se konstatuje, že společně



1. Kyselina cyklopiazonová (A — kyselina alfa cyklopiazonová; B — imin kyseliny cyklopiazonové; C — kyselina beta cyklopiazonová — bisecodehydrocyclopiazono-vá) — Cyclopiazonic acid (A — alpha-cyclopiazonic acid; B — cyclopiazonic acid imine; C — beta-cyclopiazonic acid — bisecodehydrocyclopiazonic acid)

podávání obou mykotoxinů neovlivnilo u pokusných zvířat toxické účinky této směsi. Ovšem uvedené pokusy byly dělány ve formě subakutní toxicity a autoři vyslovili domněnku, že jiné možnosti vzájemného vlivu by mohly nastat při chronickém působení těchto mykotoxinů.

Pokud se týká přirozeného výskytu CPK v poživatinách, ve kterých byla nalezena v malých množstvích, jde o kukuřici [Gallagher aj., 1978], arašidy [Lansden a Davidson, 1983] a sýry camembertského typu [Still aj., 1978; Le Bars, 1979; Schoch aj., 1984; Ostrý a Polster, 1987; Lohniský a Šimůnek, 1987; Šimůnek aj., 1987].

Mezi potraviny a krmiva, z nichž byly izolovány mikromycety produkující CPK, patří masné výrobky — párky, salámy, šunka [Leistner, 1984], kukuřice, krmivo pro morčata a krocany, krmivové směsi [Gallagher aj., 1978], sušené fazole, šrot, makaróny, oříšky [Truckseess aj., 1987], sušené krmné směsi pro drůbež, pšenice [Veselý aj., 1985].

Protože u nás dosud nebyl dělán soustavný základní průzkum na obsah CPK a jejich eventuálních producentů v poživatinách jak rostlinného, tak živočišného původu, uskutečnili jsme tento dílčí průzkum a výsledky jsou zachyceny v předkládané práci. Vedle toho u několika vybraných sbírkových kmenů jsme sledovali také jejich schopnost produkovat CPK *in vitro* na sladinkovém agaru se sójovým peptonem.

MATERIÁL A METODY

VÝBĚR VZORKŮ

Vzorky jsme odebírali z běžné obchodní sítě po dobu šesti měsíců, část jich poskytli pracovníci MěHS Brno. Jednotlivé skupiny vzorků jsou znázorněny v tab. I.

ZÁKLADNÍ MYKOLOGICKÝ ROZBOR POŽIVATIN

K základnímu mykologickému rozboru poživatin jsme použili metodiku, kterou popsala Jesenská (1987). Sbírkové kmeny *Penicillium nalgoviensis* 321, 322, 328 jsme získali od dr. L. Pokorné ze Sbírký čistých mlékařských kultur Mlékárenského průmyslu Praha. Kmeny *Penicillium commune* a *Penicillium aurantiogriseum* byly získány z Československé sbírký mikroorganismů v Brně.

I. Přehled poživatin zkoušených na výskyt kyseliny cyklopiazonové (CPK) — A survey of foods examined for the content of cyclopiazonic acid (CPK)

Druh poživatiny	Počet vzorků	Výskyt CPK
Cereálie	13	2
Polotovary z cereálií	22	1
Hotové těstoviny	8	0
Plísňové sýry (seškrab povrchu)	7	6
Luštěniny	5	0
Maso, masné výrobky	2	2
Arašidy (loupané)	1	1

CPK = kyselina cyklopiazonová

STANOVENÍ TOXINOGENITY KMENŮ

Toxinogenitu čistých izolátů mikromycet na produkci CPK jsme stanovili metodikou, kterou uvedli Polster aj. (1988), toxinogenitu čistých izolátů *Aspergillus flavus* na produkci aflatoxinu B₁ podle metodiky, kterou popsali Folster a Lefnerová (1977).

METODIKA VYŠETŘOVÁNÍ POŽIVATIN NA OBSAH CPK

Vlastní extrakce a reextrakční čistící postup

50 g vzorku + 2 ml HCl + 100 ml chloroformu (CHCl₃) — extrakce třepáním 2 × 5 minut na laboratorní třepačce. Filtrací vzorku po extrakci získáme hrubý chloroformový extrakt. Ten je dále extrahován 150 ml NaHCO₃ po dobu 2 × 5 minut. Po skončení extrakce je zásaditá fáze o pH ≈ 8 až 9 oddělena od chloroformové fáze v dělicí nálevce a okyselena 6N HCl na pH = 2. Následuje reextrakce získané okyselené fáze se 100 ml CHCl₃ po dobu 5 minut. Získaný čistý chloroformový extrakt pak odvodníme filtrací přes bezvodý síran sodný a zahustíme na měřitelný zbytek.

Metoda stanovení CPK ve finálních extraktech pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Použili jsme desky Silufol promyté metanolem a impregnované 8% kyselinou šťavelovou v metanolu a aktivované při teplotě 80 °C po dobu 40 minut.

Vyvíjecí směs — toluen: octan etylnatý: kyselina mravenčí (5 : 4 : 1). Skvrny CPK jsme detekovali na chromatogramu po usušení na vzduchu postříkem 1% p-dimethylaminobenzaldehydu ve směsi 75 ml etanolu a 25 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Stanovení CPK je semikvantitativní srovnáním barevné intenzity vzestupné řady koncentrací standardu CPK. Mez citlivosti uvedené metody je 25 ng na skvrnu a 0,02 μg · g⁻¹ poživatiny nebo krmiva.

Izolace čistě CPK

Použitý kmen: *Penicillium griseofulvum* CCM 8006.

Živné médium: tekutá půda s 2% kvasničného autolyzátu a 2,5% sacharózy.

Po 21denní kultivaci při teplotě 25 °C jsme zpracovali obsah 20 Erlenmayerových baněk (1000 ml) s 200 ml živné půdy a narostlým myceliem.

Vlastní zpracování: obsah jedné Erlenmayerovy baňky + 3 ml 6N HCl + 300 ml CHCl₃. Extrahujeme na třepačce 20 minut, necháme stát v temnu a chladu do druhého dne a potom extrahujeme třepáním 10 minut. Filtrací oddělíme mycelium a chloroformový extrakt s živnou půdou a každé zvlášť zpracujeme.

Mycélium utřeme v třecí misce s bezvodým síranem sodným, dáme do 1000 ml Erlenmayerovy baňky a extrahujeme na třepače 10 minut se 200 ml chloroformu. Extrakt pak odvodníme filtrací přes bezvodý síran sodný a zahustíme na objem 100 ml. Extrakt je pak připraven k dalšímu zpracování reextrakčním čisticím postupem. Druhou část po filtraci, tj. chloroformový extrakt s živnou půdou, zpracujeme takto: chloroformový extrakt oddělíme v dělicí nálevce od živné půdy. Takto získaný chloroformový extrakt odvodníme filtrací přes nálevku s bezvodým síranem sodným a zahustíme na objem 100 ml.

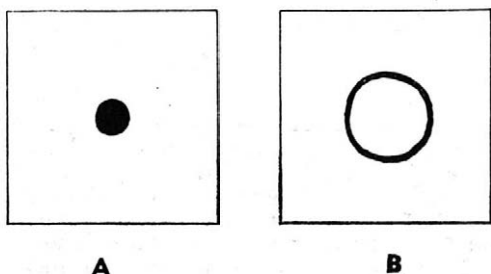
Dále následuje reextrakční čisticí postup. Extrakty o objemech 100 ml extrahujeme 2X 20 minut 1N NaHCO_3 na třepače. V dělicí nálevce oddělíme zásaditou vodní fází $\text{pH} = 9$ a okyselíme ji na $\text{pH} = 2$ 6N HCl . Okyselenou vodní fází reextrahujeme 2X 100 ml CHCl_3 2X 5 minut, zahustíme na měřitelný zbytek 500 μl .

Preparativní TLC

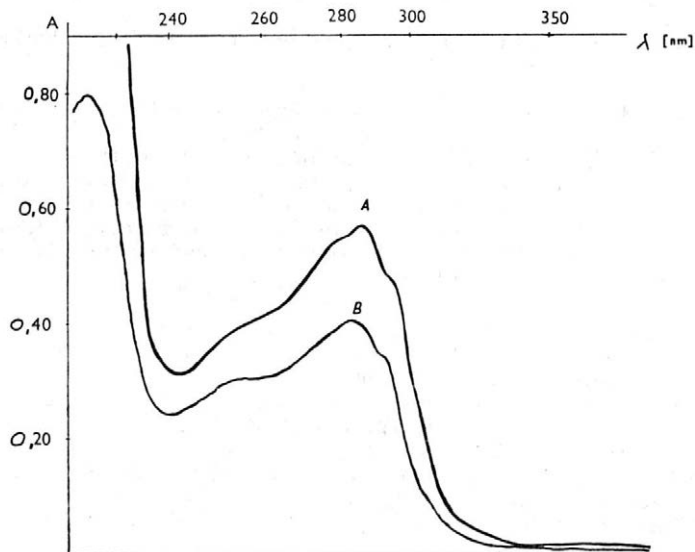
Příprava desek: Byly použity skleněné desky se silikagelovou vrstvou (Kieselgel G 60 Merck) o výšce 0,6 mm. Hotovou desku předčistíme metanolem, impregnujeme 2% kyselinou šťavelovou v etanolu a desku aktivujeme při teplotě 105 °C jednu hodinu. Po aktivaci ji uložíme do exsikátoru.

Extrakt nanášíme velmi citlivě malými kroužky v průměru asi 3 mm na startovací linku. Překrýváním kroužků tak vytvoříme pás.

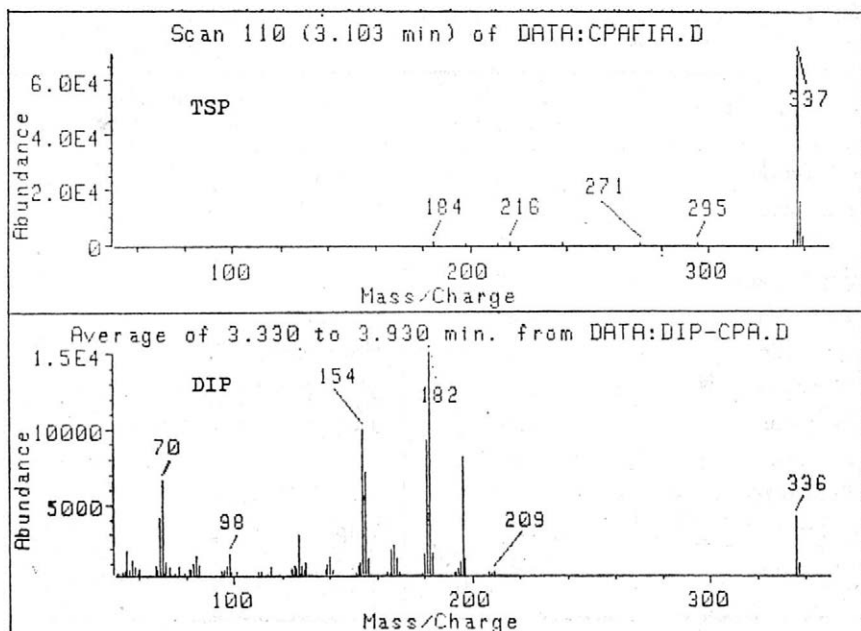
Použitá vyvíjecí směs: CHCl_3 :metylizobutylketon (4:1). Při vyvíjení chromatogramu, zvláště na začátku, zahříváme fénem stejnoměrně celý spodek TLC kyvety. Ke konci vyvíjení vyjmeme chromatogram z kyvety a necháme ho důkladně v temnu odvětrat. Detekci chromatogramu provádíme z levé strany



2. Prstencový test na stanovení kyseliny cyklopiazonové — CPK (A — deska neimpregnovaná; B — deska impregnovaná 8% kyselinou šťavelovou v metanolu) — A ring test for the determination of cyclopiazonic acid — CPK (A — a nonimpregnated plate; B — a plate impregnated with 8% oxalic acid in methanol)



3. UV charakteristika kyseliny cyklopiazonové (CPK) v metanolu (A — CPK vlastní produkce; B — CPK získaná od prof. L. Leistnera) — UV characteristics of cyclopiazonic acid (CPK) in methanol (A — our own CFK isolate; B — CPK received from prof. L. Leistner)



4. Hmotová spektra kyseliny cyklopiazonové (CPK) — Mass spectra of cyclopiazonic acid (CPK)

desky vertikálním nanášením malých množství detekčního činidla (1% p-dimethylaminobenzaldehydu ve směsi 75 ml etanolu + 25 ml koncentrovaného chlorovodíku). Na vytvořeném pásu v bodě styku detekčního činidla a CPK dojde k reakci a místo zřívání. Tím můžeme ohraničit pás výskytu CPK, který skalpelem vyškra- beme. Takto získaným silikagelem naplníme skleněnou kolonku 150 X 10 mm a ne- cháme prokapat CHCl_3 (cca 20 ml). U získaných frakcí vykonáme prstencový test. Principem testu je metoda založená na cirkulárním vyvíjení. Z desky Silufol 20 X 20 cm nastříháme čtverce 50 X 50 mm, tzn., že z jedné desky získáme 16 čtverců. Polovinu čtverců impregnujeme 8% kyselinou šťavelovou v metanolu, dru- há polovina destiček zůstane neimpregnovaná. Na destičku nanese extrakt frak- ce 5 μl a přikapáváme po jednotlivých kapkách 5 X 20 μl chloroformu. Po detekci p-dimethylaminobenzaldehydem vznikne fialový prstenec u desky impregnované a fialový kroužek u desky neimpregnované (obr. 2).

Všechny získané frakce obsahující CPK odpaříme na co nejnížší objem na vakuovém odpařovači a dvakrát přesrážíme metanolem. UV charakteristika námi získané CPK (Specord UV-VIS, NDR) plně odpovídá UV spektru standardu CPK poskytnutého prof. L. Leistnerem z Ústavu pro výzkum masa, Kulmbach, NSR (Schoch aj., 1984) (obr. 3). Hmotové spektrum námi získané CPK stanovil na hmotovém spektrometru Hewlett-Packard (HP 5988 A) dr. L. Knesel z KHES v Brně. Toto hmotové spektrum je srovnatelné a odpovídá hmotovému spektru CPK uváděnému v literatuře (Cole, 1984) obr. 4).

VÝSLEDKY

Uvedenou modifikovanou metodou podle Dornera aj. (1983) za použití kmene *Penicillium griseofulvum* CCM 8006 a tekuté živné pů- dy jsme získali 521 mg CPK.

Výsledky stanovení CPK v poživatinách rostlinného a živočišného původu uvádějí tab. I a II. Podle tab. I obsahovalo CPK 20 % vyšetřo-

II. Přehled poživatin s nálezem kyseliny cyklopiazonové (CPK) — A list of foods in which cyclopiazonic acid (CPK) was detected

Druh poživatiny	Obsah CPK [mg.kg ⁻¹]	Poznámka (úprava vzorku)
Rýže 1. jakosti	0,20	loupaná
Rýže 2. jakosti	0,15	loupaná
Kroupy	0,20	velké č. 10
Arašídý 2. jakosti	0,20	loupané
Sýr Hermelín	0,40	povrchový plísňový seškrab
Sýr Hermelín	0,30	povrchový plísňový seškrab
Sýr Hermelín	0,50	povrchový plísňový seškrab
Sýr Hermelín	0,25	povrchový plísňový seškrab
Sýr Hermelín	0,05	3mm podpovrchová vrstva po seškrabu
Sýr Bavaria blue	0,30	povrchový seškrab
Salám Poličan	0,15	slupka a 3 mm povrchové vrstvy
Vepřové maso	0,25	zaplísňený seškrab s 3mm podpovrchovou vrstvou

CPK — kyselina cyklopiazonová

vaných poživatin. Výsledky jsou poněkud zkresleny výskytem u sýrů camembertskeho typu, u kterých je výskyt CPK obvyklý. Tab. II ukazuje konkrétní hodnoty semikvantitativního stanovení CPK v poživatinách. V tab. III jsou zachyceny kmeny *Aspergillus flavus* vyšetřované na produkci CPK a aflatoxinů. 47 % všech kmenů bylo bitoxinogenních (produkovalo CPK a aflatoxin). Tab. IV ukazuje nálezy mikromycet *Penicillium*

III. Nálezy *Aspergillus flavus* a jeho toxinogenita na kyselinu cyklopiazonovou (CPK) a aflatoxiny (AF) — Occurrence of *Aspergillus flavus* and its toxicogenic effects on cyclopiazonic acid (CPK) and aflatoxin (AF)

Celkem	Netoxinogenní kmeny	Produkce		
		CPK	AF	CPK + AF
19 (100 %)	2 (10,5 %)	7 (36,8 %)	1 (5,26 %)	9 (47,4 %)

IV. Nálezy kmenů *Penicillium* sp. (mimo *Penicillium camemberti*) toxinogenních na kyselinu cyklopiazonovou (CPK) — Findings of strains of *Penicillium* sp. (except *Penicillium camemberti*) with toxicogenic effects on cyclopiazonic acid (CPK)

Celkem	CPK pozitivní kmeny	CPK negativní kmeny
17 (100 %)	4 (23,5 %)	13 (76,5 %)

sp. (mimo *Penicillium camemberti*). 23,5 % zachycených kmenů bylo toxinogenních na produkci CPK.

Při vyšetřování kmenů *Penicillium nalgoviensis* 321, 322, 328 na sladinkovém agaru se sójovým peptonem uvedené kmeny při teplotě 25 °C po dobu 21 dní CPK neprodukovaly. Sbírkové kmeny *Penicillium commune* F-426 a *Penicillium aurantiogriseum* F-708 jsou naopak dobrými producenty CPK na sladinkovém agaru při teplotě 25 °C po dobu 21 dní.

DISKUSE

Zatím velmi málo prací se zabývá vztahy a interakcemi mezi jednotlivými mykotoxiny a jejich následným působením na živý organismus. Zajímavá je otázka bitoxinogenity u mikromycety *Aspergillus flavus*. I z našich výsledků je zřejmé, že bitoxinogenních kmenů je většina. CPK se pravděpodobně spolu s aflatoxiny podílela na nemoci X, při níž v roce 1961 uhynulo v Anglii 100 000 krůfat (Porter aj., 1988). Khera aj. (1985) citují starší zprávu o možném podílu CPK na etiologii karcinomu jater u domorodců kmene Bantu. Rao a Husain (1985) v Indii identifikovali v semenech prosa kmeny *Aspergillus flavus* a *Aspergillus tamarii*, které produkovaly CPK jako možného původce otravy Kodo u lidí a hospodářských zvířat. CPK by byla tedy dalším etiologickým agens, které vedle cytochalasinů, produkovaných mikromycetou *Phenopsis paspalli*, tuto otravu způsobuje.

Výsledky záchytu CPK u sýrů se pohybovaly od 0,05 do 0,5 mg . kg⁻¹. Sýry s vyššími hodnotami CPK byly již senzoričky změněné a rozteklé. Zajímavé je, že CPK difunduje i do podpovrchových vrstev sýra (3 mm). Schoch aj. (1984) stanovili ve francouzských sýrech camembertského typu hodnoty 0,25 a 0,37 mg . kg⁻¹ a ve švýcarských sýrech 0,08 mg . kg⁻¹, Le Bars (1979) hodnoty 0,05 až 1,5 µg . g⁻¹. Still aj. (1978) hodnotili sýry, které během zrání byly uchovány pět dní při teplotě 25 °C — hodnota CPK byla 0,4 mg . kg⁻¹.

Z toho lze usoudit, že jedinou prevencí výskytu CPK v sýrech camembertského typu je dodržování technologického postupu, tzn. teploty a doby zrání. Sýry by neměly být expedovány nedozrálé. To pak spotřebitele svádí k tomu, aby nechal tento sýr dozrát při pokojové teplotě. Od distribuce do obchodní sítě až po spotřebu by měly být sýry uchovány v chladničce při teplotě do 10 °C.

Námi nalezené hodnoty CPK u vzorku arašidů (0,2 mg . kg⁻¹) lze srovnat s výsledky, ke kterým dospěli Lansden a Davidson (1983). Tito autoři zjistili v arašidech vyřazených z prodeje až 1088 µg . kg⁻¹ CPK. Přirozený výskyt CPK u tepelně neopracovaných masných výrobků (tzn. u salámu Poličan), v baleném mase, podobně jako v rýži a kroupách, nebyl zatím — pokud je nám známo — nikde zaznamenán a publikován. Musíme však konstatovat, že oba vzorky salámu i masa byly proti normě změněny. Salám Poličan byl porostlý mikromycetou zelené barvy (*Penicillium species*), která produkovala *in vitro* na sladinkovém agaru CPK. Vepřové maso (*m. longissimus dorsi*) bylo baleno v ochranné atmosféře složené z 20 % CO₂ a 80 % O₂ a bylo vlivem poruchy chlazení v chladničce porostlé mikromycetou *Penicillium* sp. Tento kmen byl rovněž produkční.

Můžeme říci, že námi vyšetřované sbírkové kmeny *Penicillium nalgoviensis* Laxa neprodukovaly *in vitro* na sladinkovém agaru se sójovým peptonem uvedenou CPK. Tyto kmeny, které dříve sloužily jako kulturní plísň při výrobě nalžovského sýra, se nyní používají při některých technologiích v masném průmyslu v NSR, ale zatím není známo, že by produkovaly mykotoxiny (výjimkou je jeden kmen pozitivní na produkci CPK ze 113) (El Banna, 1987). Hodnoty CPK námi zjištěné jsou nízké a nepředstavují z hygienicko-toxikologického hlediska akutní nebezpečí pro člověka a hospodářská zvířata. Při výskytu vyšších hodnot CPK se už požívatina sensoricky začíná měnit, proto musí být vyřazena z lidské výživy, neměla by však být použita ani jako krmivo pro hospodářská zvířata.

Problém by mohl nastat u potravinových surovin pocházejících ze subtropických a tropických oblastí, které u nás slouží jako polotovary pro další zpracování na finální výrobky. Z těchto pohledů se tedy i nadále tímto mykotoxinem zabýváme.

Literatura

- COLE, P. J.: Cyclopiazonic acid and related toxins. In: BETINA, V.: Mycotoxins production, isolation, separation and purification. Amsterdam — Oxford — New York — Tokio, Elsevier 1984, s. 405-414.
- DORNER, J. W. — COLE, R. J. — LOMAX, L. G. — GROSSER, H. S. — DIENER, V. L.: Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effect on broiler chickens. Appl. Envir. Microbiol., 46, 1983, s. 698-703.
- DORNER, J. W. — COLE, R. J. — DIENER, U. L.: The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. Mycopathologia, 87, 1984, s. 13-15.
- EL BANNA, A. A. — PITT, J. I. — LEISTNER, L.: Production of mycotoxins by *Penicillium species*. System appl. Microbiol., 4, 1987, s. 364-366.
- GALLAGHER, R. T. — RICHARD, J. L. — STAHR, H. M. — COLE, R. J.: Cyclopiazonic acid production by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. Mycopathologia, 66, 1978, s. 31-36.
- JESENSKÁ, Z.: Mikroskopické houby v požívatínách a krmivech. Bratislava, Alfa 1987, 319 s.
- KHERA, K. S. — COLE, R. J. — WHALEN, C. — DORNER, J. W.: Embryo-toxicity study on cyclopiazonic acid in mice. Bull. envir. Contam. Toxicol., 34, 1985, s. 423-426.
- LANSDEN, J. A. — DAVIDSON, J. I.: Occurrence of cyclopiazonic acid in peanuts. Appl. envir. Microbiol., 45, 1983, s. 766-769.
- LE BARS, J.: Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. Appl. envir. Microbiol., 38, 1979, s. 1052-1055.
- LEISTNER, L.: Toxicogenic penicillia occurring in feeds and foods. Fd Technol. Aust., 36, 1984, s. 404-406.
- LOHNINSKÝ, J. — ŠIMŮNEK, J.: Produkce kyseliny cyklopiazonové *Penicillium camemberti* a její výskyt v sýrech Hermelín. Veter. Péče potr. Prům., 4, 1987, s. 56-59.
- LUK, C. K. — KOBBE, B. — TOWNSEND, J. M.: Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* Link. Appl. envir. Microbiol., 33, 1977, s. 211-212.
- MORRISSEY, R. E. — NORRED, W. F. — HINTON, P. M.: Combined effects of the mycotoxin B₁ and cyclopiazonic acid on Sprague-Dawley rats. Fd chem. Toxicol., 25, 1987, s. 837-842.
- OSTRÝ, V. — POLSTER, M.: Hygienicko-toxikologická problematika mykoflóry používané k výrobě sýrů. Veter. Péče potr. Prům., 4, 1987, s. 48-50.
- POLSTER, M. — ŠIMŮNEK, J. — OSTRÝ, V. — ALBRECHTOVÁ, A.: Výskyt kyseliny cyklopiazonové a aflatoxinů u plísni *Aspergillus flavus* izolovaných z požívatiny a krmiv. Českoslov. Hyg., 1988, v tisku.

- POLSTER, M. — LEFNEROVÁ, D.: Stanovení toxinogentiy *Aspergillus flavus*. In: Sbor. přednášek ze semináře komise mikrobiologie potravin. ČSAV, Liblice 1977, s. 97-102.
- PORTER, J. K. — NORRED, W. P. — COLE, R. J. — DORNER, J. W.: Neurochemical effects of cyclopiazonic acid in chickens. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 187, 1988, s. 335-339.
- RAO, B. L. — HUSAIN, A.: Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing „kodua poisoning“ in man and its production by associated fungi. Mycopathologia, 89, 1985, s. 177-180.
- SCHOCH, U. — LÜTHY, J. — SCHLATTER, C.: Mycotoxine von *P. roqueforti* und *P. camemberti* in Käse. Milchwissenschaft, 39, 1984, s. 76-80.
- STILL, P. — ECKHARD, CH. — LEISTNER, L.: Bildung von Cyclopiazonsäure durch *Penicillium camemberti* — Isolate von Käse. Fleischwirtschaft, 58, 1978, s. 876-877.
- SIMŮNEK, J. — ANČIKOVÁ, L. — KACHLÍK, P.: Kyselina cyklopiazonová — stanovení a detekce producentů. Veter. Péče potr. Prům., 4, 1987, s. 56-59.
- TRUCKSEES, M. W. — MISLIVEC, P. B. — YOUNG, K. — BRUCE, V. R. — PAGE, S. W.: Cyclopiazonic acid production by cultures of *Aspergillus* and *Penicillium* sp. isolated from dried beans, corn meal, macaroni, and pecans. J. Assoc. off. analyt. Chem., 70, 1987, s. 123-126.
- VESELÝ, D. — VESELÁ, D. — NEUMANNOVÁ, V.: Produkce cyklopiazonové kyseliny, její účinky na kuřecí zárodek a na jednodenní kohoutky. Veter. Med. (Praha), 30, 1985, s. 345-352.

Došlo dne 22. 7. 1988

ОСТРЫ, В. — ПОЛСТЕР, М. (Центр гигиены пищевых промышленных звеньев, Институт гигиены и эпидемиологии, Брно): Открытие циклопиазоновой кислоты и ее продуцентов в пищевых продуктах. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 421-430.

В течение шести месяцев мы обследовали 60 проб пищевых продуктов на содержание циклопиазоновой кислоты. Пробы прошли основное микологическое исследование с направлением на штаммы *Aspergillus flavus* и *Penicillium* sp. Величины циклопиазоновой кислоты в пробах сыров Гермелин, арахиса, риса, крупы, колбасы Поличан и упакованного мяса не превысили ни у одного образца 0,5 мг/кг. Путем модифицированной изоляции циклопиазоновой кислоты Дорнера и кол. (1983) мы получили 521 мг данного микотоксина из штамма *Penicillium griseofulvum* CCM 8006 на жидкой среде с 2% дрожжевого аутолизата и 2,5% сахарозы. 47% изолированных штаммов *Aspergillus flavus* было битоксиногенных (производили циклопиазоновую кислоту и афлатоксин). 23,5% обнаруженных штаммов *Penicillium* sp. производили циклопиазоновую кислоту. Сборные штаммы *Penicillium nalgoviensis* непроизводили *in vitro* на агаре сусли с соевым пептоном циклопиазоновой кислоты. Штаммы *Penicillium commune* F-426 и *Penicillium aurantiogriseum* F-708 являются хорошими продуцентами этой кислоты.

природное наличие; пищевые продукты; микромицеты; битоксиногенита; микотоксины

OSTRÝ, V. — POLSTER, M. (Centre for the Hygiene of Food Chains, Brno; Institute of Hygiene and Epidemiology, Praha): Demonstration of Cyclopiazonic Acid and of its Producers in Foods. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 421-430.

In the course of six months, 60 samples of foods were examined for their contents of cyclopiazonic acid. These samples were subjected to a basal mycological screening aimed at *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. strains. Cyclopiazonic acid contents in samples of Hermelin cheese, peanuts, rice, peeled barley grains, Foličan salami, and packaged meat did not exceed the value of 0.5 mg.kg⁻¹. When using a modification of the method of cyclopiazonic acid isolation described by Dörner et al. (1983), 521 mg of this mycotoxin were isolated from a culture of *Penicillium griseofulvum* CCM 8006 strain grown in liquid medium containing 2% yeast autolysate and 2.5% sucrose. About 47% of the isolated *Aspergillus flavus* strains were bitoxicogenic (produced both cyclopiazonic acid and aflatoxin). Cyclopiazonic acid was produced by 23.5% of the isolated *Penicillium* sp. strains. No cyclopiazonic

acid was produced *in vitro* by *Penicillium nalgoviensis* strains from the Czechoslovak collection on sweet wort agar containing peptone from soybean. *Penicillium commune* F-426 and *Penicillium aurantiogriseum* F-708 strains are efficient producers of this acid.

natural occurrence; foods; micromycetes; bitoxicogenic properties; mycotoxins

OSTRÝ, V. — POLSTER, M. (Zentrum für Hygiene der Lebensmittelketten, Institut für Hygiene und Epidemiologie, Brno): *Nachweis von Cyklopiazonsäure und ihren Produzenten in Lebensmitteln*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 421-430.

Im Verlauf von 6 Monaten untersuchten wir an die 60 Lebensmittelproben auf den Gehalt an Cyklopiazonsäure. Die Proben unterzogen wir einer grundlegenden mykologischen Untersuchung auf das Vorkommen der Stämme *Aspergillus flavus* und *Penicillium* sp. Die Werte der Cyklopiazonsäure in Proben von Hermelin-Käse, Araschiden, Reis, Graupen, Salami „Poličan“ und von Fleisch in Verbraucherpackung überstiegen bei keiner Probe 0,5 mg.kg⁻¹. Mittels einer modifizierten Methode zur Isolation der Cyklopiazonsäure nach Dorner (1983) gewannen wir 521 mg dieses Mykotoxins des Stammens *Penicillium griseofulvum* CCM 8006 auf flüssigem Boden mit 2 % Hefeautolysat und 2,5 % Saccharose. 47 % der isolierten Stämme *Aspergillus flavus* waren bitoxigen (sie produzierten die Cyklopiazonsäure und Aflatoxin). 23,5 % der aufgefangenen Stämme *Penicillium* sp. produzierten die Cyklopiazonsäure. Die Sammlungsstämme *Penicillium nalgoviensis* produzierten *in vitro* auf Würzeagar mit Sojapepton keine Cyklopiazonsäure. Die Stämme *Penicillium commune* F-426 und *Penicillium aurantiogriseum* F-708 sind als gute Produzenten dieser Säure anzusehen.

natürliches Vorkommen; Lebensmittel; Mikromyzeten; Bitoxinogenität; Mykotoxine

Adresa autorů:

MVDr. Vladimír Ostrý, doc. RNDr. Miroslav Polster, CSc., Centrum hygieny potravinových řetězců, institut hygieny a epidemiologie, Palackého 1 — 3, 612 42 Brno

FLUOROMETRICKÉ HODNOCENÍ AFLATOXINOGENITY KMENŮ PLÍSNĚ *ASPERGILLUS FLAVUS* A *ASPERGILLUS PARASITICUS* PO KULTIVACI V TEKUTÉM MÉDIU

M. Dvořák, A. Láníková, S. Kosková, I. Diblíková

DVOŘÁK, M. — LÁNÍKOVÁ, A. — KOSKOVÁ, S. — DIBLÍKOVÁ, I. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Fluorometrické hodnocení aflatoxinogenity kmenů plísně Aspergillus flavus a Aspergillus parasiticus po kultivaci v tekutém médiu*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 431-439.

Zjišťovali jsme tvorbu aflatoxinu (AF) v tekutém syntetickém médiu GV po kultivaci kmenů *A. flavus* a *A. parasiticus* sbírkových nebo izolovaných z krmiv a arašidů. Aflatoxinogenita byla hodnocena posouzením fluorescence po nanesení média na filtrační papír a měřením intenzity emise chloroformového extraktu média na fluorescenčním spektrofotometru. V extraktech s intenzitou emise 0-880 při dvou stupních citlivosti přístroje byla stanovena koncentrace AFB₁ testem RIA v rozsahu 0 až 54,5 mg.l⁻¹. Intenzita emise nebyla v lineárním vztahu k hladině AFB₁ v médiu a byla větší než při odpovídající koncentraci standardního roztoku AFB₁. Fluorometrická metoda je mnohonásobně citlivější než vizuální hodnocení fluorescence média na filtračním papíru a to bylo spolehlivější než hodnocení fluorescence při kultivaci kmenů se slabou tvorbou AF na pevném APA médiu. Tuto i další screeningové metody předčí použitá fluorometrická metoda svou citlivostí a časovou úsporou zejména při použití extraktu z média k další upřesňující analýze.

Aspergillus; aflatoxin; kultivační média; diagnostika; fluorescenční spektrofotometrie

Plísně skupiny *Aspergillus* jsou v přírodě značně rozšířeny a potenciálně aflatoxinogenní *A. flavus* a *A. parasiticus* se běžně vyskytují u různých zemědělských komodit. Jen menší část jejich kmenů izolovaných z krmiv nebo potravin však byla schopna produkovat aflatoxin (AF): 19,3 % v USA (Trucksess aj., 1987), 15 % ve Španělsku (Carballo a Miguel, 1987), 7,1 % v ČSSR (Polster aj., 1985). Pro podmínky ČSSR je pozoruhodné zjištění, že většina aflatoxinogenních kmenů *A. flavus* byla nalezena u potravin a krmiv z tropických a subtropických zemí, kdežto u potravin tuzemských pouze 0,8 % kmenů produkovalo AFB₁ (Jesenská a Polster, 1983). Nebyla prokázána korelace mezi detekcí plísně a obsahem AF v kukuřici; mnohé vzorky i s vysokým počtem konidií neobsahovaly AF a naopak (Dutton a Westlake, 1985). Rovněž zjištění, že příjem experimentálně kontaminovaného krmiva s obsahem až 37.10⁵ konidií *A. flavus* v jednom gramu nepůsobilo u mladých prasat zdravotní ani produkční poruchy (Dvořák, nepublikováno), dokládá potřebu doplňovat mykologické

vyšetření při posuzování zdravotní nezávadnosti krmiv o stanovení aflatoxinogenity izolovaných kmenů *A. flavus* a *A. parasiticus*.

K detekci plísni produkujících AF lze použít, jak o tom svědčí značný počet referátů, různých metod, které je možné v podstatě rozdělit do čtyř skupin. V první skupině jsou metody založené na produkci toxinu v tekutých nebo pevných substrátech s navazujícími extrakčními a purifikačními procedurami a finální chromatografickou detekcí. Druhá skupina zahrnuje metody spočívající na zjištění fluorescence, kterou AF působí při kultivaci plísně na speciálních agarových půdách. Ve třetí skupině se používá detekce AF difundovaného do agarového média chromatografií jeho malých částí bez extrakce nebo purifikace. Poslední, nová metoda spočívá ve stanovení aflatoxinogenity plísně podle černé barvy na UV fotografii (Yabe aj., 1987).

Základním předpokladem všech testačních metod je kultivace na médiu podporujícím syntézu AF (Buchanan aj., 1987). Z pevných substrátů je k tomu nejčastěji používána rýže, podzemnice olejná a karlovarské suchary (Šimůnek, 1981; Polster aj., 1985; Wei a Jong, 1986; Carballo a Miguel, 1987), z pevných kultivačních půd agar označovaný např. jako GYA, CAM, APA, AFPA, v nichž hlavními složkami je glukóza, drcený kokosový ořech, kvasničný nebo kukuřičný výtažek (Hara aj., 1974; Bottalico a Frisullo, 1981; Sim aj., 1985; Yabe aj., 1987; Davis aj., 1987; Carballo a Miguel, 1987). Tekutá syntetická nebo semisyntetická média používaná k produkci AF zpravidla obsahují glukózu nebo sacharózu, kvasničný extrakt, asparagin nebo dusičnan sodný, popřípadě síran amonný a v různém zastoupení minerální látky a stopové prvky (Ehrlich a Ciegler, 1984; Tiwari aj., 1986; Trucksess aj., 1987; Davis aj., 1987; Buchanan aj., 1987).

V předložené práci je popsáno ověřování metody, kterou jsme použili k hodnocení produkce AF a různých experimentálních podmínek *in vitro* vedoucích k jeho kvantitativním změnám (Dvořák, 1989) z hlediska použitelnosti této metody při testaci aflatoxinogenity kmenů *A. flavus* a *A. parasiticus* měřením intenzity fluorescence po kultivaci v tekutém médiu a po extrakci.

MATERIÁL A METODY

Z použitých kmenů byly dva kmeny sbírkové: *A. parasiticus* F-550 (NRRL 2999) tvořící AFB₁, B₂, G₁ a G₂ a aflatoxinogenní *A. flavus* F-108. Aflatoxinogenní *A. flavus* 295 byl získán z OHS Gottwaldov. Dalších 33 kmenů bylo izolováno z krmiv nebo z oříšků podzemnice olejné. Byly uchovávány na sladinkovém agaru.

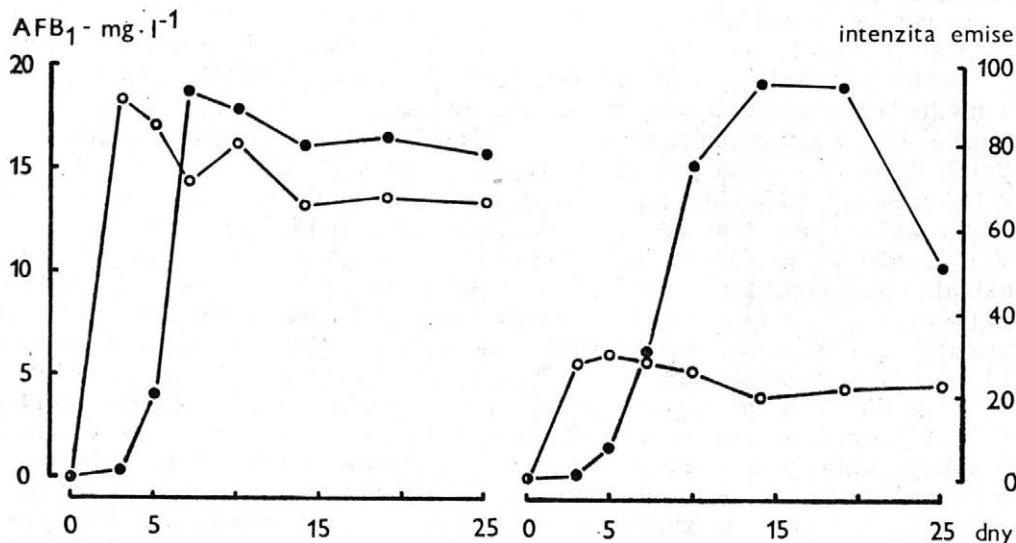
Syntetické tekuté médium GV bylo připravováno metodou, kterou popsali Ehrlich a Ciegler (1984) a obsahovalo v jednom litru destilované vody 85 g sacharózy, 10 g asparaginu, 3,5 g (NH₄)₂SO₄, 10 g KH₂PO₄, 2 g MgSO₄·6H₂O, 75 mg CaCl₂·2H₂O, 10 mg ZnSO₄·7H₂O, 5 mg MnCl₂·4H₂O, 2 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 2 mg Na₂B₄O₇ a 2 mg FeSO₄·7H₂O. Dále bylo použito semisyntetické tekuté médium, které uvedli Tiwari aj. (1963), s obsahem 150 g sacharózy a 20 g kvasničného extraktu v litru vody.

Erlenmeyerovy baňky obsahující 20 až 100 ml tekutého média byly inokulovány s 1 až 10·10⁶ konidií z čerstvých kultur plísně suspendovaných ve sterilní destilované vodě a inkubovány při teplotě 28 °C obvykle pět až osm dní. Po inkubaci jsme 0,05 ml čirého média nanесли na filtrační papír a po zaschnutí při pokojové teplotě ozářili pro detekci fluorescence UV světlem z Woodovy lampy nebo v přístroji Fluotest Universal (NDR). Další 0,2 ml média jsme přenesli do zkumavky

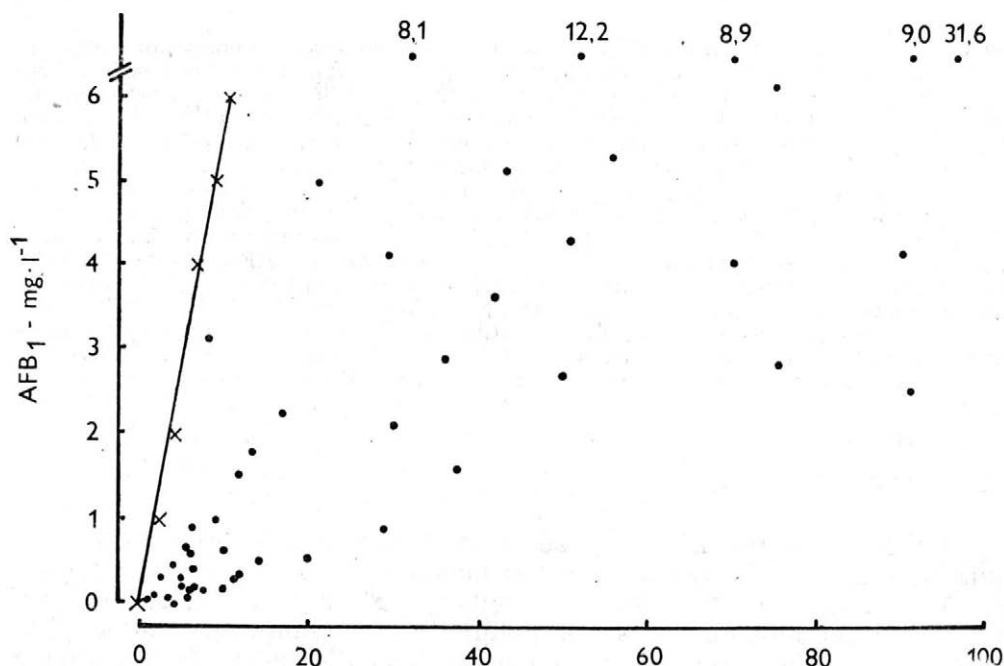
se zabroušenou zátkou a extrahovali se 6 ml chloroformu intenzivním třepáním jednu minutu. Po ustání jsme odsáli vodnou fázi, přidali špetku bezvodého síranu sodného a po protřepání jsme extrakt přefiltrovali. Fluorescenci jsme měřili na fluorescenčním spektrometru Perkin Elmer při citlivosti 0,7 a 7 (s rozsahem intenzity emise 0 až 1100) a při vlnových délkách excitace a emise 365 a 420 nm pro AF (Pons a Goldblatt, 1969) a 395 a 495 nm pro sloučeninu, v kterou je konvertována kyselina kojová (Lee aj., 1986). Potom byl chloroformový extrakt pod proudem dusíku odpařen, aby mohla být stanovena koncentrace AF s použitím soupravy RIA-test-AFLA B₁ (ÚRVJT Košice). Stejným postupem jsme měřili fluorescenci sterilních kultivačních médií a standardních roztoků AFB₁ (Calbiochem, La Jolla, CA). Pro zjištění použitelnosti tekutého média a citlivosti metody byla vizuálně hodnocená fluorescence na filtračním papíru srovnávána s fluorescencí stanovenou stejným způsobem u kultur narostlých po desetidenní inkubaci při teplotě 28 °C na šikmém Czapekově agaru s obsahem 0,05 % kukuřičného výluhu, označovaném jako APA (Hara aj., 1974) a ke stanovení aflatoxinogenity často používaném.

VÝSLEDKY

Kultivací kmenů *A. flavus* 295 a *A. parasiticus* F-550 v médiu GV bylo potvrzeno, že poskytuje vhodné podmínky pro růst plísně i tvorbu AF. V průběhu 25denní inkubace s odběry vzorků 3., 5., 7., 10., 14., 19. a 25. den po inokulaci dosáhla hladina AFB₁, stanovená testem RIA, maxima pátý den inkubace u kmene *A. flavus* a sedmý den u kmene *A. parasiticus*. Potom se u obou mírně snižovala. Intenzita fluorescence extraktů, měřená na fluorescenčním spektrofotometru při citlivosti 0,7, se prvních sedm dní zvyšovala v souladu se vzestupem hladin AFB₁ v médiu, svými hodnotami v dalším průběhu se však od nich i mezi použitými kmeny lišila (obr. 1). Nejužší vztah mezi hodnotami AFB₁ a intenzitou emise byl zaznamenán sedmý den.



1. Hladina AFB₁ a intenzita emise při citlivosti 0,7, zjištěné v extraktu média GV po 3 až 25denní kultivaci kmene *A. flavus* (nevyplněné kroužky) a *A. parasiticus* (vyplněné kroužky) — AFB₁ levels and emission intensity at spectrophotometer sensitivity setting of 0,7, detected in GV medium extract following 3- to 25-day-long cultivations of *A. flavus* (open circles) and *A. parasiticus* (solid circles) strains



2. Vztah mezi koncentrací standardního AFB₁ (křížky spojené přímkou), AFB₁ stanoveného v médiu metodou RIA (kroužky) a intenzitou emise (osa x) měřené na fluorescenčním spektrofotometru při citlivosti 7 — Relationships between the concentrations of standard AFB₁ (crosses fitted by a straight line), the concentrations of AFB₁ detected in the medium using RIA method (circles), and emission intensity (x-axis) determined in a fluorescence spectrophotometer at a sensitivity setting of 7

Pětidenní kultivací 25 kmenů *Aspergillus* v médiu GV a současně v médiu s kvasničným extraktem bylo zjištěno, že jejich růst a zejména tvorba AF jsou v druhém médiu na vyšší úrovni. U 11 kmenů produkujících AFB₁ byla jeho průměrná hladina 29,9 mg.l⁻¹ (1,7—66), kdežto v GV médiu 9,0 mg.l⁻¹ (0,3—44,3). Asi třikrát nižší po kultivaci v GV médiu byla také průměrná intenzita emise (35,7 a 13,9 při citlivosti 0,7). V jednotlivých případech však byl po kultivaci v médiu s kvasničným extraktem rozporuplný vztah mezi intenzitou emise a hladinou AFB₁ (21:9 mg.l⁻¹, 5:66 mg.l⁻¹), která svou výší někdy přesahovala odpovídající fluorescenci standardního chloroformového roztoku AFB₁ (obr. 2). Falešně vysokou hodnotu AFB₁ i intenzity emise dávalo i sterilní médium. Po odečtení tohoto pozadí nebyla produkce AF zjištěna ze 14 dalších kmenů u osmi kmenů shodně po kultivaci jak v médiu GV, tak v médiu s obsahem kvasničného extraktu. Přednost byla dána kultivaci v GV médiu, a to i vzhledem ke zjištění, že i při vyšší intenzitě emise extraktu z média s kvasničným extraktem než z GV média nebyla fluorescence na filtračním papíru pro tmavé zabarvení média vždy detekována, kdežto při kultivaci téhož kmene v GV médiu ano.

Celkem — kromě uvedeného — jsme analyzovali více než 300 GV médií po kultivaci různými kmeny *A. flavus* a jednoho *A. parasiticus* v různých experimentálních podmínkách. U extraktů, u nichž byla fluo-

rescence měřena při citlivosti přístroje 7, jsou uvedeny vztahy intenzity emise ke stanovené hladině AFB₁ v obr. 2, s výjimkou většiny výsledků s intenzitou emise menší než 5 a výsledků měřitelných již při citlivosti přístroje 0,7. V obr. 2 jsou také udány hodnoty fluorescence standardního AFB₁ stanovené při koncentraci 1 až 6 mg . l⁻¹; intenzita emise byla relativně malá. Naproti tomu u extraktů z médií byla ve vztahu k hodnotám stanoveným RIA mnohonásobně vyšší, a to u všech měření. Z 98 analýz s intenzitou emise menší než 5 nebyla fluorescence na přístroji detekována v 11 případech, z nichž testem RIA nebyl AFB₁ zjištěn šestkrát a pětkrát bylo zjištěno 3 až 20 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Naopak v 21 případech při intenzitě emise 1 až 5 nebyl AFB₁ testem RIA prokázán. Dalších 52 extraktů médií bylo měřeno při citlivosti 0,7. Testem RIA stanovené hladiny AFB₁ byly v rozsahu 2,5 až 54,5 mg . l⁻¹. Tyto mezní hodnoty byly zjištěny při intenzitě emise 16 a 88. Ve většině případů nebyla přímá relace mezi naměřenou fluorescencí a stanovenou hladinou AFB₁.

Při měření intenzity emise při vlnových délkách 395 a 495, použitých pro stanovení sloučeniny, v kterou je konvertována kyselina kojová, byly naměřeny hodnoty v určitém přímém nelineárním vztahu k hodnotám emise při vlnových délkách použitých pro AF. Byly podstatě nižší v extraktech z GV médií než z médií obsahujících kvasničný extrakt, a to po kultivaci i sterilních. Byly zjištěny i při měření roztoků standardního AFB₁, a nejsou proto ve vztahu k tvorbě kyseliny kojové ani AF dále hodnoceny.

Pro stanovení aflatoxinogenity použitých kmenů na základě skvrn na filtračním papíru vytvořených kápnutím 0,05 ml čirého média porostlého plísní byla zjištěna minimální koncentrace AFB₁, která vyvolá po ozáření patrnou (=), výraznou (+) a velmi výraznou (++) fluorescenci. Při použití standardního chloroformového roztoku AFB₁ to bylo ve stejném pořadí 1, 2 a 6 mg . l⁻¹ na skvrnách o průměru 4 cm. Při použití ředěných médií po kultivaci *A. parasiticus* F-550 to bylo 0,7, 1,2 a 3,0 mg . l⁻¹ testem RIA stanoveného AFB₁ na skvrnách o průměru 3 cm.

U kmene *A. parasiticus* F-550, kmene *A. flavus* F-108 a 33 kmenů *A. flavus* izolovaných z různých krmiv a z oříšků podzemnice olejné jsme porovnávali čtyři metody a jejich citlivost k průkazu tvorby AF. Kmen F-550 měl velmi výraznou fluorescenci na APA půdě, po kultivaci na GV médiu jeho skvrna na filtračním papíru měla ++ fluorescenci, intenzita emise jeho extraktu byla 40 při citlivosti 0,7 a testem RIA bylo zjištěno 44,2 mg . l⁻¹. Sbírkový kmen 108 měl ve stejném pořadí tento charakter: =, +, 28 při citlivosti 7, AFB₁ 5,0 mg . l⁻¹. Z 33 vyšetřených izolovaných kmenů měly ++ nebo + fluorescenci na APA tři kmeny s dalšími charakteristikami: ++ nebo +, 7—75 při citlivosti 7, AFB₁ 1,6 až 6,6 mg . l⁻¹. Další sedm kmenů mělo na APA fluorescenci =, která byla shodná s fluorescencí média na papíře ve dvou případech (2 a 3 při citlivosti 7, AFB₁ 10 a 53 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), v dalších dvou případech byla na papíře + (2 a 8 při citlivosti 7, AFB₁ 75 a 150 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) a u tří případů se na papíře fluorescence neprojevila (2 a 3 při citlivosti 7, AFB₁ 0, 0,1 a 3,4 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). Z 23 kmenů, které byly na APA negativní, měly dva kmeny na papíře fluorescenci + (6 a 7 při citlivosti 7, AFB₁ 0,9 a 3,6 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) a dva kmeny = (2 a 4 při citlivosti 7, AFB₁ 169 a 450 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). U zbývajících kmenů se fluorescence na APA ani na papíře neprojevila (1—3 při citlivosti 7, AFB₁ 0—70 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$).

Při hodnocení dosažených výsledků je třeba vycházet z několika základních skutečností. K přesnému stanovení jednotlivých AF se používá kvantifikace intenzity jejich fluorescence v UV světle po extrakci biologického materiálu, čištění extraktu a chromatografickém dělení. Stanovení AFB₁ testem RIA představuje rozšíření diagnostických možností, je však třeba počítat s tím, že dává falešně pozitivní hodnoty (Fukal aj., 1987). Fluorescenční vlastnosti jednotlivých AF nejsou stejné. V chloroformovém prostředí je intenzita fluorescence u AFG₁ a G₂ asi třicetkrát větší než u AFB₁ a B₂. Vedle jmenovaných aflatoxinů, AFM₁, M₂, B_{2a} a G_{2a} jsou však známé i další fluoreskující metabolity *A. flavus* (Pons a Goldblatt, 1969). Rovněž kyselina kojová, toxický metabolit plísně *Aspergillus*, je konvertována peroxidázou ze substrátu v sloučeninu se zelenožlutou fluorescencí, která může vznikat i degradací AF (Lee aj., 1986). Další artefakty působí fluoreskující pyraziny (Montville a Goldstein, 1987). Metody přesné analýzy AF jsou dost náročné, jen materiálové náklady na stanovení obsahu AFB₁ v krmivu dvojrozměrnou chromatografií na tenké vrstvě silikagelu činí asi 122 Kčs (Palásek aj., 1984). Pro zesílení citlivosti analýzy je doporučována přeměna AFB₁ na více fluoreskující deriváty (Gregory a Manley, 1980).

Použití chromatografických metod je rozhodující pro určení, zda plísně skupiny *Aspergillus* mají schopnost produkovat jednotlivé AF nebo ne. Hranice detekovatelnosti je 1 ng . ml⁻¹ (Trucksess aj., 1987), popřípadě stopy AF při tvorbě menší než 0,1 µg . ml⁻¹ nebo 0,1 µg . g⁻¹ (Wei a Jong, 1986). Vzhledem k tomu, že množství AF produkovaná na různých médiích se mohou lišit, je rozhodující prokázat toxinogenitu, tj. sebemenší tvorbu AF. Při jejím posuzování jen na základě fluorescence kultivovaného média nejsou malá množství AF zjištělná (Clevström a Ljunggren, 1985). Přesto se však pro diagnostiku aflatoxinogenních kmenů velmi často používá posouzení fluorescence jejich porostů na vhodných médiích, často na půdě APA. Intenzita fluorescence na něm získaná je i po slabším růstu při dobré kvalitě kukuřičného výluhu větší než na agaru CAM, kde ji větší kolonie mohou zastínit (Davis aj., 1987).

APA byl použit i v naší studii a ve srovnání s intenzitou fluorescence kultivovaného GV média naneseného na filtračním papíru byl méně spolehlivý při sporné a nezjištěné fluorescenci. V takových případech bylo možné zjistit na papíru produkci AF na GV médiu v množství 0,075 a 0,9 mg . l⁻¹, při měření fluorescence extraktu kultivovaných médií na fluorescenčním spektrofotometru však v množství podstatně nižším, potvrzeném v kombinaci s použitím testu RIA. Při intenzitě emise menší než 5 při citlivosti přístroje 7 a při hodnotách RIA menších než 20 µg . l⁻¹ jsou však výsledky problematické, a to pro pravděpodobný obsah fluorogenů jiných než AF, popřípadě pro sníženou věrohodnost testu RIA. I za těchto předpokladů však použitá metoda představuje pro diagnostiku závažnou okolnost: zachycení kmenů slabě produkujících v médiích AF, které u používaných screeningových metod nebyly detekovatelné. Nebyl zjištěn lineární vztah mezi intenzitou emise extraktů z médií GV a hladinou AFB₁ stanovenou RIA. Fluorescence byla podstatně intenzivnější než při měření standardního roztoku AFB₁. Vzhledem

k uvedeným literárním údajům to bylo možné očekávat. Výrazné rozdíly mezi intenzitou emise a hodnotami AFB₁ byly zejména při kultivaci kmene *A. parasiticus* F-550. Produkuje totiž mnohem více AFG₁ než B₁ a již po sedmidenní inkubaci se absolutní i relativní obsah AFB₁ v médiu snižuje (Rusul a Marth, 1987).

Nelze předpokládat, že by hodnocení hladiny AF produkovaného v GV médiu pomocí měření intenzity emise na fluorescenčním spektrofotometru mohlo nahradit kvantitativní analýzu chromatografickými postupy. Je však několikanásobně citlivější než kterákoliv jiná screeningová metoda. Má i mnoho dalších výhod. Lze zajistit větší bezpečnost práce než při použití pevných živných substrátů, poskytuje časovou i finanční úsporu; z materiálových nákladů je nejdražší chloroform k extrakci. V případě potřeby mohou být médium a extrakt použity nejen k RIA AFB₁, ale i k chromatografickému stanovení jednotlivých AF v souladu s ON 46 7710 (1986). Při zachování standardních postupů, zejména množství média, velikosti inokula a sedmidenní inkubace, doplňuje při hodnocení hygienické kvality krmiv mykologické vyšetření a jejich posouzení jen podle nálezu počtu konidií *A. flavus*. Určení jejich aflatoxinogenity pravděpodobně sníží množství krmiv s omezeným použitím a získají se podklady pro zajištění konzervace krmiv s nálezem kmenů produkujících AF.

Literatura

- BOTTALICO, A. — FRISULLO, S.: Osservazioni su alcuni metodi culturali per il riconoscimento di specie di *Aspergillus* e di loro isolati aflatoxigeni. *Phytopath. Mediterr.*, 20, 1981, s. 96-100.
- BUCHANAN, R. L. — JONES, S. B. — GERASIMOWICZ, W. V. — ZAIKA, L. L. — STAHL, H. G. — OCKER, L. A.: Regulation of aflatoxin biosynthesis: Assessment of the role of cellular energy status as a regulator of the induction of aflatoxin production. *Appl. environ. Microbiol.*, 53, 1987, s. 1224-1231.
- CARBALLO, M. — DE MIGUEL, J. A.: Rapid detection of aflatoxin-producing strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from mixed feed and cereal grain in Spain. *J. Sci. Fd Agric.*, 40, 1987, s. 11-15.
- CLEVSTRÖM, G. — LJUNGGREN, H.: Aflatoxin formation and the dual phenomenon in *Aspergillus flavus* Link. *Mycopathologia*, 92, 1985, s. 129-139.
- DAVIS, N. D. — IYER, S. K. — DIENER, U. L.: Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Appl. environ. Microbiol.*, 53, 1987, s. 1593-1595.
- DUTTON, M. F. — WESTLAKE, K.: Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa. *J. Assoc. off. analyt. Chem.*, 68, 1985, s. 839-842.
- DVOŘÁK, M.: Schopnost bentonitu a přírodního zeolitu adsorbovat aflatoxin z tekutých prostředí. *Veter. Med. (Praha)*, 34, 1989, s. 307-316.
- EHRLICH, K. — CIEGLER, A.: Effect of phytate on aflatoxin formation by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in synthetic media. *Mycopathologia*, 87, 1984, s. 99-103.
- FUKAL, L. — SOVA, Z. — REISNEROVÁ, H. — RAUCH, P.: Problematika interferencí při radioimunochemickém stanovení aflatoxinu B₁ v biologickém materiálu. *Biol. chem. Vet. (Praha)*, 23, 1987, s. 557-564.
- GREGORY, J. F. I. — MANLEY, D. B.: Analysis of aflatoxins in foods derived from animals by high performance reversed phase chromatography. *Altex Chromatogram*, 4, 1980, s. 3-4.
- HARA, S. — FENNELL, D. I. — HESSELTINE, C. W.: Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. *Appl. Microbiol.*, 27, 1974, s. 1118-1123.

- JESENSKÁ, Z. — POLSTER, M.: Zur Ökologie der Aflatoxin B₁ produzierenden Stämme von *Aspergillus flavus*. Z. ges. Hyg. Grenzgeb., 29, 1983, s. 515-517.
- LEE, L. S. — PARRISH, F. W. — JACKS, T. J.: Substrate depletion during formation of aflatoxin and kojic acid on corn inoculated with *Aspergillus flavus*. Mycopathologia, 93, 1986, s. 105-107.
- MONTVILLE, T. J. — GOLDSTEIN, P. K.: Sodium bicarbonate reduces viability and alters aflatoxin distribution of *Aspergillus parasiticus* in Czapek's agar. Appl. enviro. Microbiol., 53, 1987, s. 2303-2307.
- ON 46 7710: Metoda stanovení aflatoxinů. 1986.
- PALÁSEK, J. — BARTOŠ, J. — GAJDUŠKOVÁ, V. aj.: Ověření nových metod kontroly produkce nezávadných potravin. [Výzkumná zpráva.] Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno 1984. 47 s.
- POLSTER, M. — HARTLOVÁ, D. — KRÁLÍKOVÁ, I.: Frekvence výskytu aflatoxinogenních variant *Aspergillus flavus* v prostředí potravinářských zařízení. Českoslov. Hyg., 30, 1985, s. 442-446.
- PONS, W. A. — GOLDBATT, L. A.: Physicochemical assay of aflatoxins. In: GOLDBATT, L. A. (Ed.): Aflatoxin. New York and London, 1969, s. 77-105.
- RUSUL, G. — MARTH, E.: Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of potassium benzoate or potassium sorbate and at different initial pH values. J. Fd Protect., 50, 1987, s. 820-825.
- SIM, T. S. — TEO, T. — SIM, T. F.: A note on the screening of dried shrimps, shrimp paste and raw groundnut kernels for aflatoxin-producing *Aspergillus flavus*. J. app. Bact., 59, 1985, s. 29-34.
- ŠIMŮNEK, J.: Determination of toxicogenic activity of *Aspergillus flavus*. Scripta med. (Brno), 54, 1981, s. 61-64.
- TIWARI, R. P. — MITTAL, V. — BHALLA, T. C. — SAINI, S. S. — SINGH, G. — VADEHRA, D. V.: Effect of metal ions on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Folia microbiol., 3, 1986, s. 124-128.
- TRUCKSESS, M. W. — MISLIVEC, P. B. — YOUNG, K. — BRUCE, V. R. — PAGE, S. W.: Cyclopiazonic acid production by cultures of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from dried beans, corn meal, macaroni, and pecans. J. Assoc. off. analyt. Chem., 70, 1987, s. 123-126.
- WEI, D. L. — JONG, S. CH.: Production of aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* group maintained in ATCC. Mycopathologia, 93, 1986, s. 19-24.
- YABE, K. — ANDO, Y. — ITO, M. — TERAOKA, N.: Simple method for screening aflatoxin-producing molds by UV photography. Appl. environ. Microbiol., 53, 1987, s. 230-234.

Došlo dne 11. 8. 1988

ДВОРЖАК, М. — ЛАНИКОВА, А. — КОСКОВА, С. — ДИБЛИКОВА, И. (Научно-исследовательский институт ветеринарии, Брно): Флуорометрическая оценка афлатоксигенов штаммов плесени *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus* после культивации в жидкой среде. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 1989 (7) : 431-439.

Мы определяли образование афлатоксина (АФ) в жидкой синтетической среде GV после культивирования штаммов *A. flavus* и *A. parasiticus* сборных или изолированных из кормов и арахисов. Афлатоксигенита была оценена обследованием флуоресценции после нанесения среды на фильтрационную бумагу и измерением интенсивности эмиссии хлороформового экстракта среды на флуоресценционном спектрофотометре. В экстрактах с интенсивной эмиссией 0-880 при двух степенях чувствительности прибора была установлена концентрация АФБ₁ путем теста RIA в диапазоне 0—54,5 мг. л. Интенсивность эмиссии не была в линейном отношении к уровню АФБ₁ в среде и была выше чем при соответствующей концентрации стандартного раствора АФБ₁. Флуорометрический метод во много раз чувствительнее, чем визуальная оценка флуоресценции среды на фильтрационной бумаге, а это было надежнее чем оценка флуоресценции при культивации штаммов со слабым образованием АФ на плотной ФРА среде. Эти и другие селекционные методы превосходит использованный флуорометрический метод своей чувствительностью и временной экономией, главным образом при использовании экстракта из среды для дальнейшего уточняющего анализа.

Aspergillus; афлатоксин; среды культивации; диагностика; флуоресцентная спектрофотометрия

DVOŘÁK, M. — LÁNIKOVÁ, A. — KOSKOVÁ, S. — DIBLÍKOVÁ, I. (Veterinary Research Institute, Brno): *Fluorometric Evaluation of Aflatoxicogenic Effects of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus Strains Cultured in Liquid Media*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 431-439.

The production of aflatoxin (AF) by *A. flavus* and *A. parasiticus* strains originating either from the Czechoslovak collection or isolated from feed mixtures and from peanut samples was determined following their cultivation in liquid synthetic GV medium. Their aflatoxicogenic effects were estimated from fluorescence of the GV medium after its application onto filter paper or by determining emission intensity of chloroform extracts of the medium in a fluorescence spectrophotometer. In extracts with emission intensity from 0 to 880 at two sensitivity settings of the device, AFB₁ concentration was found to be in the range from 0 to 54.5 mg.l⁻¹ when determined by means of the RIA method. Emission intensity was not in a linear relationship with AFB₁ level in the medium and was higher than at a corresponding concentration of AFB₁ standard solution. The fluorometric method is many times more sensitive than visual assessment of medium fluorescence on filter paper, which, for its part, was more reliable than the estimation of fluorescence following the cultivation of strains with low AF production on solid APA medium. This and other screening methods are surpassed by the employed fluorometric method as far as the sensitivity and saving of time are concerned, especially when medium extract is used for further more precise analysis.

Aspergillus; aflatoxin; culture media; diagnostics; fluorescence spectrophotometry

DVOŘÁK, M. — LÁNIKOVÁ, A. — KOSKOVÁ, S. — DIBLÍKOVÁ, I. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): *Fluorometrische Bewertung der Aflatoxinogenität der Stämme der Schimmelpilze Aspergillus flavus und Aspergillus parasiticus nach Kultivierung im Flüssigmedium*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 431-439.

Wir untersuchten die Bildung von Aflatoxin (AF) im synthetischen Flüssigmedium GV nach Kultivierung der Stämme *A. flavus* und *A. parasiticus*, die gesammelt oder aus Futtermitteln und Erdnüssen isoliert worden waren. Die Aflatoxinogenität wurde bewertet anhand der Beurteilung der Fluoreszenz nach Auftragen des Mediums auf das Filterpapier und mittels der Messung der Intensität der Emission des Chloroformextraktes des Mediums am Fluoreszenzspektrofotometer. In den Extrakten mit einer Emissionsintensität von 0-880 bei zwei Empfindlichkeitsstufen des Gerätes wurde die AFB₁-Konzentration anhand des RIA- Tests in einem Bereich von 0 bis 54,5 mg.l⁻¹ festgelegt. Die Emissionsintensität war in keiner linearen Beziehung zum AFB₁-Spiegel im Medium und war grösser als bei der entsprechenden Konzentration der AFB₁-Standardlösung. Die fluorometrische Methode ist viel empfindlicher als die visuelle Bewertung der Fluoreszenz des Mediums auf dem Filterpapier und diese war zuverlässiger als die Bewertung der Fluoreszenz bei der Kultivierung der Stämme mit einer schwachen AF-Bildung auf einem festen APA des Mediums. Diese als auch die weiteren Screening-Methoden werden von der angewendeten fluorometrischen Methode an Empfindlichkeit und Zeitersparnis insbesondere beim Einsatz des Extraktes aus dem Medium für eine weitere präzisierende Analyse übertroffen.

Aspergillus; Aflatoxin; Kultivierungsmedien; Diagnostik; Fluoreszenzspektrofotometrie

Adresa autorů:

MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., MVDr. Alena Láničková, RNDr. Stanislava Kosková, RNDr. Ivana Diblíková, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

POKYNY PRO AUTORY VĚDECKÝCH ČASOPISŮ ČSAZ

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky a současný stav v dané oblasti.

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být připojen souhlas vedoucího pracoviště s publikací článku a prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

Jednotlivé práce nemají přesahovat rozsah 12 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI (ČSN 01 1300).

Technická úprava rukopisu

Úprava rukopisu má odpovídat státní normě ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádek, mezi řádky dvojité mezery). Ilustrace, grafy, tabulky a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na zadní straně se vyznačí tužkou pořadové číslo obrázku nebo grafu a napíše se jméno autora článku. Texty k obrázkům a grafům se dodávají na zvláštním listě, umístění se označuje na levém okraji příslušné strany rukopisu číslicí v kroužku. Tabulky se číslují zvlášť římskými číslicemi.

Vlastní úprava práce

Název práce (titul) nemá přesahovat 85 úhozů. Jména autorů se uvádějí bez titulů s počátečním písmenem jména.

Souhrn — Vypracování souhrnu je nutné věnovat obzvláštní péči. Autor do něho má shrnout vše, co je na jeho práci pozoruhodné a nové a co má být dokumentováno. Souhrn má být nekritickým informačním výběrem významného obsahu a závěru článku, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, nemá ji však nahradit. Nesmí překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl psán celými větami a ne telegrafickým způsobem. Souhrn začíná jménem autorů, adresou pracoviště, titulem článku a citací časopisu.

Klíčová slova (Key words, index terms) — Připojují se po vynechání řádku pod souhrn. Klíčovým slovem rozumíme substantivum, které je nutné pro věcné zařazení předložené práce. Klíčová slova se řadí směrem od obecnějších výrazů ke konkrétním. Začínají malým písmenem a oddělují se středníkem. Jejich počet závisí na povaze práce a neměl by klesnout pod tři a převýšit dvanáct slov.

Úvod — Má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce uskutečněna a velmi stručnou formou stav studované otázky. Je nutno se v něm vyhnout rozsáhlým historickým přehledům. Uvádí se bez nadpisu, je možné v něm uvést k práci se vztahující autory, přičemž se doporučuje co nejnižší počet autorů.

Materiál a metoda — Metody se popisují pouze tehdy, jsou-li původní, jinak postačuje citovat autora metod a uvádět jen případné odchylky. Je v nich popsán pokusný materiál. Popis metody by měl umožnit, aby kdokoli z odborníků mohl podle něho a při použití uvedených citací práci opakovat.

Výsledky — Doporučuje se nepoužívat k vyjádření kvantitativních stavů tabulek a dát přednost grafům, anebo tabulky shrnout v statistickém hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse — Obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostacích a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se ocitovat jen ty autory, kteří mají k publikované práci bližší vztah), pokud mají souvislost nebo jsou s předloženou prací nějak srovnatelné.

Literatura — Musí odpovídat státní normě ČSN 01 0197, tj. citace seřadit abecedně podle jména prvních autorů; příjmení (verzálkami); zkratka jména (dvojtečka); plný název práce (tečka); úřední zkratka časopisu, ročník, rok vydání, číslo, první stránka — poslední stránka (před číslo se uvádí zkratka č. a před první stránku s.); u knih je uvedeno místo vydání, vydavatel a rok. Odkazy na literaturu v textu jsou uvedeny jménem autora (čárka) a rokem vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu.

Pokud autor používá v práci zkratk jakéhokoliv druhu, je nutné je vysvětlit, aby se předešlo omylům při překladech. V názvu práce a v souhrnu je lépe zkratku nepoužívat.

Na zvláštním listě uvede autor plné jméno (i u spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSČ.

FERTILIZAČNÁ KAPACITA EJAKULÁTU NUTRIÍ (*MYOCASTOR COYPUS*) PO EXSTIRPÁCII SEMENNÝCH VAČKOV ZISTENÁ TESTOM PENETRÁCIE A PRIRODZENÝM PÁRENÍM

I. Jakubička, M. Barta, P. Babušík

JAKUBIČKA, I. — BARTA, M. — BABUŠÍK, P. (Výskumný ústav živočišnej výroby, Nitra): *Fertilizačná kapacita ejakulátu nutrií (*Myocastor coypus*) po exstirpácii semenných vačkov zistená testom penetrácie a prirodzeným párením*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 441-446.

Sledovali sme fertilizačnú schopnosť spermii samcov nutrií po exstirpácii semenných vačkov. Pri sledovaní sme použili test penetrácie do vajčeka chrčka sýrskeho (*Mesocricetus auratus*). Ejakuláty od piatich samcov sme získali elektroejakuláciou v halothanovej narkóze. Penetračným testom zona-free hamster eggs (ZFHE) bolo zistené, že ejakuláty od všetkých chirurgicky ošetrovaných samcov boli fertilné a hodnoty ZFHE sa pohybovali od 54 do 76,6 %. Na základe prirodzeného párenia sme zistili, že odstránenie semenných vačkov samcov nutrií nemá negatívny vplyv na ich oplodňovaciu schopnosť. Od desiatich nutrií, ktoré boli napárené chirurgicky ošetrovanými samcami, bolo *post mortem* zistených 47 plodov, čo v priemere predstavuje 4,7 plodov na jednu samicu.

fertilizačná schopnosť; semenné vačky; koagulácia; elektroejakulácia v halothanovej narkóze

Špecifickou vlastnosťou ejakulátu nutrií je jeho rýchla koagulácia (Barta a Jakubička, 1986). Príčina koagulácie ejakulátu nutrií ako aj funkcia vaginálnej zátky v procese oplodňovania nie sú dostatočne preskúmané (Jakubička a Barta, 1984) a zatiaľ sa presne nevie, ktorý sekrét prídavných pohlavných žliaz koaguláciu spôsobuje.

U nutrií, podobne ako u ďalších zvierat z radu hlodavcov (Scott a Dziuk, 1959; Birnbaum a Hall, 1961; Lawson a Sorenson, 1964; Snyder, 1966; Pang a i., 1979), je snahou procesu koagulácie ejakulátu zabrániť.

Odstránenie niektorej samčej prídavnej pohlavnej žľazy môže vyvolať kombináciu viacerých procesov. Blandau a Jordan (1945) zistili, že akýkoľvek spôsob odstránenia prídavných pohlavných žliaz u kryš vedie k infertilitě, čo potvrdil svojimi prácami aj Merton (1939) u myši. Naproti tomu Pang a i. (1979) zistili, že na následnú infertilitu myši vplýva len exstirpácia semenných vačkov, zatiaľ čo odstránenie prostaty k tomuto javu nevedie.

Odstránenie prídavných pohlavných žliaz hlodavcov neovplyvňuje ani libido, ani fertilizačnú schopnosť samcov (Blandau a Jordan, 1945).

Jednou z možností overenia fertilizačnej schopnosti samcov je spermiologické vyšetrenie. Toto vyšetrenie podáva len základné informácie

o spermiogenéze, prípadne o funkčnom stave prídavných pohlavných žliaz, nemusí však dávať spoľahlivý obraz o hlavnom poslaní spermií — o schopnosti vniknúť do vajíčka a oplodniť ho.

V ostatných rokoch sa objavujú práce, ktoré sa touto otázkou zaoberajú a riešia možnosť detekcie tejto hlavnej funkcie. Princípom je hodnotenie, ako spermie prenikajú do cytoplazmy zrelého vajíčka po predchádzajúcom odstránení zóny pellucidy. Zóna pellucida predstavuje druhovo špecifickú bariéru pre spermie iného druhu. Yanna a Gimaichi (1972) zistil, že odstránením zóny pellucidy sa druhová špecifita vajíčka stráca. Experimentálne dokázal, že vajíčka chrčka sýrskeho zbavené zóny pellucidy môžu byť oplodnené kapacitovanými spermiami morčafa. Takto boli získané i medzidruhové oplodnenia u ďalších druhov cicavcov (Hanada a Chang, 1976; Imai ai., 1977; Pavlok, 1979; Babušík a Majerčiak, 1983).

Pretože ejakulát nutrií bezprostredne po odbere koaguluje, a tak zabraňuje uskutočniť riadenú reprodukciu, bolo naším cieľom zabrániť uvedenému javu exstirpáciou semenných vačkov a zároveň zistiť, či exstirpácia semenných vačkov samcov nutrií neovplyvňuje ich fertilizačnú schopnosť.

MATERIÁL A METÓDY

HODNOTENIE FERTILIZAČNEJ SCHOPNOSTI SAMCOV NUTRIÍ PO EXSTIRPÁCII SEMENNÝCH VAČKOV TESTOM PENETRÁCIE DO VAJÍČKA CHRČKA SÝRSKEHO (*MESOCRICETUS AURATUS*)

Na hodnotenie fertilizačnej kapacity spermií sme použili oocyty dospelých samčiek chrčka sýrskeho. K indukcii superovulačného efektu u samičiek bol intraperitoneálne injektovaný PMSG (Antex-Leo, Copenhagen) v množstve 20 až 30 IU na 0,2 ml fyziologického roztoku. Po 74 hodinách sme za účelom vyvolania ovulácie intraperitoneálne injektovali HCG (Praedyn Spofa) v dávke 15 až 20 IU na 0,2 ml fyziologického roztoku. Ovulácia sa u samičiek dostavila za 14 až 16 hodín. V tomto čase boli zvieratá v éterovej narkóze usmrcované. Exstirpované vaječníky s vajcovodami sme umiestňovali do Petriho misiek s kultivačným médiom TCM-199.

Po perforácii vajcovodov v ich ampulárnej oblasti sme vyplavené vajíčka preniesli mikropipetou do roztoku hyaluronidázy (Sevac-Praha) 190 TRU .ml⁻¹ za účelom odstránenia kumulárnych buniek. Po dvoch minútach sme vajíčka preniesli do čerstvého kultivačného média TCM-199, v ktorom sme ich dvakrát premývali. Médium bolo obohatené lyofilizovanými rastovými proteínmi v množstve 10 mg .ml⁻¹. Takto ošetrované vajíčka sme zbavovali zóny pellucidy 0,2% roztokom chymotrypsínu (Koch-Light Laboratories Ltd., England). Približne po 10 sekundách priameho pôsobenia chymotrypsínu dochádzalo k lýze zóny. Vajíčka s odstránenou zónou sme opäť trikrát premývali v kultivačnom médiu a po ich dôkladnom premytí sme ich preniesli do chemicky čistých a sterilných Petriho misiek s obsahom 0,2 ml kultivačného média TCM-199. Uvedený obsah kultivačnej kvapky bol pokrytý parafínovým olejom. V každej kultivačnej kvapke bolo približne 20 vajíčok.

Ejakulát od piatich chirurgicky ošetrovaných samcov nutrií (exstirpované semenné vačky v blízkosti vyústenia semenovodov) sme získavali metódou elektroejakulácie v halothanovej narkóze (Barta, 1982) a bezprostredne po odbere sme hodnotili objem, motilitu a pH podľa autorov Gamčík a Kozumplík (1976). Koncentrácia spermií v ejakuláte nie je hodnotená, nakoľko získané ejakuláty koagulovali a kvantitatívne sledovanie bežnými laboratórnymi metódami nedávalo objektívne výsledky. Jedna časť ejakulátu bola použitá pre konvenčnú spermologickú analýzu objemu, motility a pH, druhá pre test penetrácie do vajíčka. Klasické spermologické vyšetrenie bolo robené minimálne dvakrát a v konečnom hodno-

tení sme sa pridržovali priemerných numerických hodnôt sledovaných spermiologických ukazovateľov.

Po 30 minútach inkubácie pri laboratórnej teplote sa spermie trikrát premývali v kultivačnom médiu a centrifúgovali pri 1300 g po dobu 10 minút. K navodeniu akrozómovej reakcie v podmienkach *in vitro* sme použili metodiku, ktorú popísal Pavlok (1979). Inkubácia spermií sa uskutočňovala v kultivačnom médiu TCM-199 pri teplote 37,5 °C a prebiehala pri umelých atmosférických podmienkach (5 % oxidu uhličitého, 90 % dusíka a 5 % kyslíka). Čas potrebný pre inkubáciu akrozómovej reakcie bol tri až štyri hodiny.

Takto inkubované spermie sme mikropipetou pridávali k vajíčkam chrčka zbaveným zóny pellucidy. Po 16-hodinovej spermaticko-vaječnej inkubácii sme vajíčka fixovali, farbili 2% orceínom a hodnotili použitím fázového kontrastu.

HODNOTENIE FERTILIZAČNEJ SCHOPNOSTI SAMCOV NUTRIÍ PO EXSTIRPÁCII SEMENNÝCH VAČKOV NA ZÁKLADE PRIRODZENÉHO PÁRENIA

Na experiment sme použili päť chirurgicky ošetrovaných samcov nutrií, ktorých sme individuálne páрили s pohlavne dospelými samičkami, pričom každý samec bol ustajnený s dvomi samičkami. Asi po dvoch mesiacoch od zabreznutia sme samičky usmrtili a zisťovali sme počet plodov a ich umiestnenie v maternici.

VÝSLEDKY

HODNOTENIE FERTILIZAČNEJ SCHOPNOSTI SAMCOV NUTRIÍ PO EXSTIRPÁCII SEMENNÝCH VAČKOV TESTOM PENETRÁCIE DO VAJÍČKA CHRČKA SÝRSKEHO (*MESOCRICETUS AURATUS*)

Výsledky sledovaných spermiologických ukazovateľov a penetračného testu skúmaného súboru samcov nutrií sú uvedené v tab. I.

I. Výsledky klasických spermiologických analýz a penetračného testu — The results of classical spermiologic analyses and of the penetration test

Samec č.	Objem [ml]	Motilita [%]	pH	ZFHE test
1	1,66	75	6,92	104/60—57,7 %
2	1,24	60	6,85	64/49—76,6 %
3	1,24	80	7,10	43/24—55,8 %
4	1,20	70	7,11	50/27—54,0 %
5	1,40	80	6,84	53/30—56,0 %

Na základe testu penetrácie sme zistili, že všetkých päť sledovaných samcov bolo fertilných a rozdiely v percente penetrácie boli u nich približne na rovnakej úrovni.

HODNOTENIE FERTILIZAČNEJ SCHOPNOSTI SAMCOV NUTRIÍ PO EXSTIRPÁCII SEMENNÝCH VAČKOV NA ZÁKLADE PRIRODZENÉHO PÁRENIA

Ako vyplýva z tab. II, na základe výsledkov prirodzeného párenia sme zistili, že exstirpácia semenných vačkov nespôsobuje infertility samcov nutrií, nakoľko deväť z desiatich samíc použitých v pokuse zabrezlo.

II. Hodnotenie fertilizačnej schopnosti samcov nutrií na základe prirodzeného párenia — An evaluation of male coypu fertility obtained in experiments with natural mating

Samec č.	Samice č.	Počet plodov v maternici		
		ľavý roh	pravý roh	spolu
1	Po, Po	2—0	0—1	3
2	P ₁ , P ₁	3—4	3—3	13
3	P ₂ , P ₂	2—6	4—1	13
4	P ₃ , P ₃	0—1	0—5	6
5	L ₁ , L ₁	3—2	3—4	12

Nižšiu plodnosť sme zistili u samičiek párených samcom č. 1. Po samcovi č. 4 zabrezla jedna samička a zistili sme u nej šesť plodov, u druhej samičky sme plody nenašli. Od desiatich nutrií, ktoré boli párené piatimi chirurgicky ošetrovanými samcami, sme *post mortem* zistili 47 plodov, čo v priemere predstavuje 4,7 plodu na jednu samicu.

Pri porovnaní výsledkov fertilizačnej schopnosti samcov zistených penetračným testom s výsledkami zistenými po prirodzenom párení uvedených samcov sú nižšie a nezodpovedajú fertilizačnej schopnosti zistenej testom ZFHE.

DISKUSIA

Testovanie fertilizačnej schopnosti samcov nutrií po exstirpácii semenných vačkov potvrdilo, že všetkých päť overovaných samcov bolo fertilných. Poukazuje to na skutočnosť, že ani elektroejakulácia v halothanovej narkóze, ani exstirpácia semenných vačkov neznižuje libido a schopnosť samcov prirodzene sa páriť, aj keď výsledky prirodzeného párenia samcov č. 1 a 4 sú nižšie ako u samcov č. 2, 3 a 5. Nižšiu fertilizačnú schopnosť uvedených samcov zistenú prirodzeným párením si možno vysvetliť aj nižšou plodnosťou samičiek č. Po, Po, alebo opozdeným nástupom estra u samičky č. P₃, i keď to v práci nebolo jednoznačne dokázané.

Pri riešení problematiky sme zistili, že ejakulát samcov nutrií získaný metódou elektroejakulácie v halothanovej narkóze po exstirpácii semenných vačkov koaguluje v porovnaní s ejakulátmi intaktných samcov pomalšie, avšak tento chirurgický zákrok nezabraňuje koagulácii. Domnievame sa, že koagulácia ejakulátu samcov nutrií nie je spôsobená len sekrétom semenných vačkov, ale podobne ako u krýs, myší a morčiat (Blandau a Jordan, 1945; Birnbaum a Hall, 1961; Lawson a Sorenson, 1964; Nejedlý, 1967; Pang a i., 1979) komplexom sekrétov samčích prídavných pohlavných žliaz.

Literatúra

- BABUŠÍK, P. — MAJERČIAK, P.: Fertilizačná kapacita čerstvého a zmrazeného kančieho ejakulátu zistená testom penetrácie. Poľnohospodárstvo, 29, 1983, s. 1061-1070.
- BARTA, M.: Možnosti využitia usmerňovanej reprodukcie v chove nutrií. In: Zbor. prednášok. X. odbor. seminára pre chovateľov kožušinových zvierat. Hradec Králové 1982, s. 108-110.
- BARTA, M. — JAKUBÍČKA, I.: Technika odberu spermy od samcov nutrií elektroejakuláciou. Ved. Práce Výsk. Úst. živoč. Výr. Nitra, XXII, 1986, s. 65-68.
- BLANDAU, R. J. — JORDAN, E. S.: A technique for the artificial insemination of the white rat. J. lab. clin. Med., 26, 1945, s. 1361.
- BIRNBAUM, D. — HALL, T.: An ejaculation technique for rats. Anat. Rec., 140, 1961, s. 49-50.
- GAMČÍK, P. — KOZUMPLÍK, J.: Umelá inseminácia a andrológia hospodárskych zvierat. Bratislava, Príroda 1976.
- HANADA, A. — CHANG, M. C.: Penetration of hamster and rabbit zona free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. J. Reprod. Fertil., 46, 1976, s. 239.
- IMAI, H. — NIWA, K. — IRITANI, A.: Penetration *in vitro* of zona-free hamster eggs by ejaculated boar spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 51, 1977, s. 495-497.
- JAKUBÍČKA, I. — BARTA, M.: Niektoré nové poznatky v reprodukčnom procese nutrií. In: Zbor. prednášok XI. seminára pre chovateľov kožušinových zvierat. Žilina 1984, s. 93-94.
- LAWSON, R. L. — SORENSON, A. M.: Ablation of the coagulating gland and consequent breeding in the albino rat. J. Reprod. Fertil., 8, 1964, s. 415-417.
- MERTON, H.: Studies on reproduction in the Albino mouse duration of life of spermatozoa in the female reproductive tract. Proc. Roy. Soc. Edinburgh, 59, 1939, s. 207-218.
- NEJEDLÝ, K.: Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat. Praha, SPN 1967.
- PANG, S. F. — CHOW, P. H. — WONG, T. M.: The role of seminal vesicle coagulation gland, and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. J. Reprod. Fertil., 56, 1979, s. 129-132.
- PAVLOK, A.: Interspecies interaction of zona-free ova with spermatozoa in mouse, rat, and hamster. Anim. Reprod. Sci., 2, 1979, s. 395.
- SCOTT, J. V. — DZIUK, P. J.: Evaluation of the electroejaculation technique and the spermatozoa thus obtained from rats, mice and guinea pigs. Anat. Rec., 133, 1959, s. 655-664.
- SNYDER, R. L.: Collection of mouse semen by electroejaculation. Anat. Rec., 155, 1966, s. 11-14.
- YANNAGIMACHI, R.: Penetration of guinea pig spermatozoa into hamster eggs *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 28, 1972, s. 477-480.

Došlo dňa 9. 9. 1988

ЯКУБИЧКА, И. — БАРТА, М. — БАБУШИК, П. (Научно-исследовательский институт животноводства, Нитра): Емкость фертильности эякулат нутрий (*Myocastor coypus*) после удаления семенных мешочков установленная путем тестирования проникания и природной случкой. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 441-446.

Мы исследовали способность фертильности спермий самцов нутрий после удаления семенных мешочков. При исследовании мы использовали тест проникновения в яичко сирийского хоряка (*Mesocricetus auratus*). Эякуляты у пяти самцов мы получили электро-эякуляцией под галотановым наркозом. Путем теста проникновения «зона-фрие гаматех егга» (ЗФГЕ) было установлено, что эякуляты полученные у всех хирургически обработанных самцов были фертильными и величины ЗФГЕ колебались от 54 до 76,6 %. На основе природной случки мы установили, что устранение семенных мешочков у самцов нутрии не влияет отрицательно на их оплодотворительную способность. У десяти нутрий, которые случались с хирургически обработанными самцами, после смерти было установлено 47 плодов, что в среднем составляет 4,7 плодов на одну самку.

фертильная способность; семенные мешочки; коагуляция; электроэякуляция в галотановом наркозе

JAKUBIČKA, I. — BARTA, M. — BABUŠÍK, P. (Research Institute of Animal Production, Nitra): *Fertility of Coypu (Myocastor coypus) Ejaculate Following the Extirpation of Seminal Vesicles as Determined by means of the Penetration Test and Natural Mating*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 441-446.

The fertility of male coypu sperm following seminal vesicle extirpation was investigated using the penetration test into the egg of Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Ejaculates were obtained from five males by means of electroejaculation under halothane narcosis. The results of the zona-free hamster eggs (ZFHE) penetration test showed that the ejaculates of all the surgically treated coypu males were fertile and that ZFHE value fluctuated from 54 to 76.6 %. The results obtained in experiments with natural mating revealed that the extirpation of male coypu seminal vesicles did not affect their fertility. In total 47 fetuses were found *post mortem* in ten coypu females covered by surgically treated males, which on average represented 4.7 fetuses per female.

fertility; seminal vesicles; coagulation; electroejaculation under halothane narcosis

JAKUBIČKA, I. — BARTA, M. — BABUŠÍK, P. (Forschungsinstitut für Tierproduktion, Nitra): *Befruchtungsvermögen des Ejakulats der Nutrias (Myocastor coypus) nach Exstirpation der Samenbeutel, festgestellt mit Hilfe des Penetrations-tests und der natürlichen Paarung*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989 (7) : 441-446.

Wir untersuchten das Befruchtungsvermögen der Spermien der Nutriamännchen nach der Exstirpation der Samenbeutel. Dazu benutzten wir den Test der Penetration ins Ei des Hamsters (*Mesocricetus auratus*). Die Ejakulate von fünf Männchen gewannen wir mittels der Elektroejakulation in der sog. Halothannarkose. Mit Hilfe des Penetrationstest „zona-free hamster eggs (ZFHE)“ konnten wir feststellen, dass die von allen chirurgisch behandelten Männchen gewonnenen Ejakulate fertil waren und dass die ZFHE-Werte von 54 bis 76,6 % schwankten. Auf Grund der natürlichen Paarung stellten wir fest, dass die Exstirpation der Samenbeutel der Nutriamännchen keinen negativen Einfluss auf ihr Befruchtungsvermögen ausübt. Von 10 Nutrias, die von chirurgisch behandelten Männchen gedeckt worden waren, wurden *post mortem* 47 Früchte festgestellt, was im Durchschnitt 4,7 Früchte je Weibchen darstellt.

Befruchtungsvermögen; Samenbeutel; Koagulation; Elektroejakulation in der Halothannarkose

Adresa autorov:

Ing. Ivor Jakubička, CSc., ing. Milan Barta, ing. Pavol Babušík, CSc., Výskumný ústav živočišnej výroby, Hlohovská 2, 949 92 Nitra

ACARI-BORNE RICKETTSIAE AND RICKETTSIONES IN EURASIA

J. Reháček, I. V. Tarasevičová

Vydavateľstvo Veda Slovenskej akadémie vied vydalo v roku 1988 prvé vydanie knihy *Acari-borne rickettsiae and rickettsiones in Eurasia* ako svoju 2806. publikáciu. Text má 344 strán a pojednáva o rickettsiázach prenášaných kliešťami (*R. conorii*, *R. sibirica*, *R. slovaca*, *R. helvetica*) a roztočmi (*R. acari*, *R. tsutsugamushi*).

Obaja autori patria medzi známych odborníkov. J. Řeháček, DrSc., je vedúcim Oddelenia rickettsií Virologického ústavu SAV v Bratislave a publikoval v tejto oblasti okolo 200 vedeckých prác. Prof. Irina Vladimirovna Tarasevičová, DrSc., je vedúcou Laboratória ekológie rickettsií Gamalejovho ústavu epidemiológie a mikrobiológie Akadémie medicínskych vied ZSSR. Patrí tiež medzi popredných odborníkov v tejto oblasti a publikovala v nej štyri knihy a okolo 150 vedeckých prác.

Monografia je určená pre špecialistov v medicínskej entomológii, parazitológii, ekológii, mikrobiológii, epidemiológii, epizootológii a všetkým tým, ktorí sa chcú zoznámiť s touto aktuálnou problematikou. Autori prezentujú nielen vlastné poznatky, ale tiež súčasný stav poznania s ohľadom na históriu, taxonómiu, geografické rozšírenie, biologické a fyzikálne vlastnosti pôvodcu, ekológiu, epidemiológiu, kliniku, diagnostiku, liečbu a tlmenie. Akcentujú biologické a ekologické aspekty, čo je dané zameraním ich vlastnej vedeckej tvorby.

Vedecká monografia vhodne dopĺňa biologicko-medicínsku literatúru nielen u nás, ale aj v celoeurópskom a ázijskom kontexte. Tvorivo spracováva údaje našich a zahraničných autorov, čo napomôže bližším záujmom o problematiku. Značná časť monografie je venovaná koxielóze — Q horúčke, ktorá v našich ekologických podmienkach má z popísaných jednotiek najväčší zdravotný význam.

Akademik Otto Jaroslav Vrtiak
Vysoká škola veterinárska, Košice

ŽIVOTNÍ JUBILEA

Životné jubileum akademika A. Ch. Sarkisova

Prednedávnom oslávil 80. výročie narodenia významný sovietsky vedec akademik VASCHNIL Artjun Christoforovič Sarkisov.

Svoj život venoval štúdiu patogénnych húb a napomohol konštituovať mykológiu ako vedné odvetvie. Je autorom vyše 200 vedeckých prác, z ktorých mnohé poznáme aj u nás v Československu. Rozsiahlu bádateľskú prácu úspešne zavŕšil početnými prioritnými výsledkami a objavmi. Artjun Christoforovič vytvoril v Sovietskom zväze svoju vlastnú vedeckú školu a vychoval 52 kandidátov a doktorov vied. Vysokého uznania a popularity dosiahli jeho monografie „Mykotoxikózy človeka a zvierat“ a ďalej „Atlas húb patogénnych pre zvieratá“, ktoré dodnes predstavujú fundamentálny prínos a pomoc pre všetkých, ktorí sa mykológiou zaoberajú. Medzi prvými na svete poukázal na veľký zdravotný význam mykotoxikóz a vypracoval základy ich diagnostiky a prevencie. Veľký ekonomický a zdravotný význam majú práce a objavy týkajúce sa imunity u dermatomykóz, zavŕšené vývojom a zavedením úspešnej vakcíny, o ktorú sa dovtedy márne usilovali mnohé vedecké pracoviská. Jeho dielo preslávilo sovietskú vedu, o čom svedčí celosvetový ohlas na jeho práce. Bol odmenený viacerými vyznamenaniami — napr. Štátnou cenou ZSSR, Štátnou cenou Estónskej socialistickej republiky a inými poctami. Technológia prípravy vakcíny proti dermatomykózam bola patentovaná nielen v krajinách RVHP, ale aj v iných štátoch — napr. v Holandsku, Dánsku, Švédsku a inde.

Objavy akademika VASCHNIL A. Ch. Sarkisova otvorili novú epochu boja s dermatomykózami, ktoré spôsobovali v celosvetovom meradle ťažko vyčísliteľné škody na zdraví ľudí a zvierat. Výsledky jeho práce hodnotíme vysoko aj u nás. Vďaka zavedeniu vakcinácie mohlo Československo — ako prvé na svete — koncom roku 1983 ohlásiť trichofytiázu dobytku za zdolanú.

Vedecká obec a s ňou všetci poľnohospodári srdečne blahoželajú jubilantovi a prajú mu pevné zdravie a mnoho ďalších rokov života.

Akademik Otto Jaroslav Vrtiak
Vysoká škola veterinárska, Košice

CONTENTS

Granátová M., Pšikal I.: Cell-mediated Immunity in Calves Immunized or Infected by Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus	385
Brouček J., Gajdošík D., Kovalčík K., Brestenský V.: Health Conditions and Metabolic Characteristics in Calves Fed Potassium Sorbate Preserved Colostrum and Unripe Milk and Milk Replacer	395
Lisák V., Vošta J., Řeháček J.: The Incidence of <i>Coxiella burnetii</i> and <i>Chlamydia psittaci</i> in Cattle Reared in Southern Bohemia	403
Míčková V., Lukášová J., Konečný S.: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Raw and Pasteurized Milk	411
Ostrý V., Polster M.: Demonstration of Cyclopiazonic Acid and of its Producers in Foods	421
Dvořák M., Láníková A., Kosková S., Diblíková I.: Fluorometric Evaluation of Aflatoxicogenic Effects of <i>Aspergillus flavus</i> and <i>Aspergillus parasiticus</i> Strains Cultured in Liquid Media	431
Jakubička I., Barta M., Babušík P.: Fertility of Coypu (<i>Myocastor coypus</i>) Ejaculate Following the Extirpation of Seminal Vesicles as Determined by means of the Penetration Test and Natural Mating	441

INHALT

Granátová M., Pšikal I.: Zellvermittelte Immunität bei durch das Virus der infektiösen bovinen Rhinotracheitis immunisierten oder infizierten Kälbern	385
Brouček J., Gajdošík D., Kovalčík K., Brestenský V.: Gesundheitszustand und metabolische Merkmale bei den mit Kolostralmilch, mit unreifer sowie mit Kaliumsorbat konservierter Milch und MilCHFuttermisch gefütterten Kälbern	395
Lisák V., Vošta J., Řeháček J.: Vorkommen von <i>Coxiella burnetii</i> und <i>Chlamydia psittaci</i> bei Rindern in Südböhmen	403
Míčková V., Lukášová J., Konečný S.: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in pasteurisierter und in Rohmilch	411
Ostrý V., Polster M.: Nachweis von Zyklapiazonsäure und ihren Produzenten in Lebensmitteln	421
Dvořák M., Láníková A., Kosková S., Diblíková I.: Fluorometrische Bewertung der Aflatoxinogenität der Stämme der Schimmelpilze <i>Aspergillus flavus</i> und <i>Aspergillus parasiticus</i> nach Kultivierung im Flüssigmedium	431
Jakubička I., Barta M., Babušík P.: Befruchtungsvermögen des Ejakulats der Nutrias (<i>Myocastor coypus</i>) nach Exstirpation der Samenbeutel, festgestellt mit Hilfe des Penetrationstests und der natürlichen Paarung	441

Rukopisy odevzdány k tisku 3. 4. 1989 — Podepsáno k tisku 5. 6. 1989

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA • Vydává Československá akademie zemědělská — Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství • Vychází měsíčně • Redaktorka ing. Jovanka Václavíčková • Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 257541 • Vytiskl MÍR, Novinářské závody, n. p., závod 6, tř. Lidových milicí 22, 120 00 Praha 2 • © Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1989

Rozšiřuje PNS. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá každá administrace PNS, pošta, doručovatel a PNS-ÚED Praha, ACT, Kafkova 19, 160 00 Praha 6; PNS-ÚED Praha, závod 02, Obránců míru 2, 656 07 Brno; PNS-ÚED Praha, závod 03, Gottwaldova tř. 206, 709 90 Ostrava 9. Objednávky do zahraničí vyřizuje PNS — ústřední expedice a dovoz tisku Praha, administrace vývozu tisku, Kovpalkova 26, 160 00 Praha 6.