



NKE
1166/92

I. díl

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

III 4 - 7 října 1993



1

Řídí redakční rada: doc. MVDr. Karel Hruška, CSc. (předseda), prof. MVDr. Jan Bouda, DrSc., prof. MVDr. Bohumír Hoffrek, doc. MVDr. Gabriel Kováč, DrSc., doc. MVDr. Imrich Maraček, CSc., MVDr. Zdeněk Pospíšil, CSc., doc. MVDr. Ivan Rosival, CSc., prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc.

Vedoucí redaktorka ing. Zdeňka Radošová

NÁRODNÍ KNIHOVNA



1000931347

OBSAH

Slanina L., Slivka P., Struháriková J., Elbertová A., Chandoga P.: Methemoglobinémie u telat nejmä vo vzťahu matka—teľa po experimentálnom ovplyvnení dusičnanmi	1
Skalka B.: Výskyt stafylokokových druhů u klinicky zdravých hospodářských zvířat	9
Čanderle J., Kummer V., Zralý Z.: Enzymatická aktivita v placentomech krav ve vztahu k průběhu porodu	21
Jalč D., Baran M., Vendrák T., Sikora P.: Vplyv monenzínu na fermentáciu diét s rôznym podielom sena a koncentrátu v umelom bachore (RUSITEC)	29
Kudweis M., Lojda Z., Juliš I.: Lysozomální aktivita enterocytů tenkého střeva selat experimentálně infikovaných kokcií <i>Isospora suis</i>	39
Babíček K., Daněk J.: Ověření metody a testace účinnosti antifasciolik proti juvenilním stádiím motolice <i>Fasciola hepatica</i> u laboratorních myší	51
Hubálek Z., Pellantová J., Hudec K., Halouzka J., Chytil J., Macháček P., Šebela M., Kubíček F.: Botulismus ptactva na vodním díle Nové Mlýny (okres Břeclav)	57

CONTENTS

Slanina L., Slivka P., Struháriková J., Elbertová A., Chandoga P.: Methaemoglobinaemia in calves, mainly in the dam — calf relation and after experimental application of nitrates	8
Skalka B.: The incidence of staphylococcus species in clinically healthy farm animals	19
Čanderle J., Kummer V., Zralý Z.: Enzymatic activity in placentomas of cows in relation to the course of parturition	27
Jalč D., Baran M., Vendrák T., Sikora P.: The effect of monensin on the fermentation of feed with different hay and concentrate proportions in (RUSITEC) rumen pouch	38
Kudweis M., Lojda Z., Juliš I.: Lysosomal activity of small intestine enterocytes in piglets experimentally infected by the coccidia <i>Isospora suis</i>	50
Babíček K., Daněk J.: Verification of the method and tests of the efficacy of antifasciolics in the control of juvenile stages of the liver fluke <i>Fasciola hepatica</i> in laboratory mice	56
Hubálek Z., Pellantová J., Hudec K., Halouzka J., Chytil J., Macháček P., Šebela M., Kubíček F.: Botulism of birds living in the region of the Nové Mlýny artificial lakes (Břeclav district)	63

MIETHEMOGLOBINÉMIA U TELIAT NAJMA VO VZŤAHU MATKA - TEĽA A PO EXPERIMENTÁLNO M OVPLYVNENÍ DUSIČNANMI

L. Slanina, P. Slivka, J. Struháriková, A. Elbertová, P. Chandoga

SLANINA, L. — SLIVKA, P. — STRUHÁRIKOVÁ, J. — ELBERTOVÁ, A. — CHANDOGA, P. (Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice; Vysoká škola veterinárska, Košice; Experimentálne výskumné stredisko, Zemplínska Teplica): *Methemoglobinémia u teliat najmä vo vzťahu matka—teľa po experimentálnom ovplyvnení dusičnanmi*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (1): 1—8.

Previedli sme terénny prieskum methemoglobínémie u zdravých a hnačkou postihnutých teliat v rôznom vekovom období ako aj porovnanie methemoglobínémie dojnic a ich novouliahnutých teliat v priemernom veku 2,5 dňa. V druhej časti práce sme previedli experimentálne ovplyvnenie organizmu teliat aplikáciou NO_3^- iónu *per os* v dávke 0,15 a 0,3 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h., ktoré vyvolali mierny až stredný stupeň klinickej methemoglobínémie. Výsledky práce oprávňujú vyjadriť sa k fyziologickej norme methemoglobínémie (do 3 % MtHb) z celkového hemoglobínu k nutnej dobe vyšetrenia methemoglobínu po príjme dusičnanov (2—8 h) vzhľadom k ich rýchlej dynamike, k významu subklinickej formy methemoglobínémie ako aj k súvislostiam s ontogenetickým vývojom teliat.

krv; methemoglobín; toxicita; dojnica; teľa; dusičnany; dusitany

Význam problematiky otráv dusičnanmi vzrastá súbežne s chemizáciou poľnohospodárstva, pričom rozhodujúci dopad na produkciu a aj ekonomiku chovu má chronická subtoxická záťaž.

Obsah methemoglobínu v krvi zvierat nepriamo poukazuje na úroveň dusičnanovej, resp. dusitanovej záťaže zvierat.

Z výsledkov, ktoré publikoval Lebeda a Kovařík (1978) je zrejmé, že v rozsahu fyziologických hodnôt methemoglobínémie uvádzaných Bartíkom a Rosivalom (1971) v rozmedzí 0,3—1,7 % bolo len 20,78 % stád. Naprostá väčšina stád (79,22 %) mala hodnoty methemoglobínémie zvýšené, väčšinou do 7 % (35,04 % stád) a ostatné stáda ešte vyššie hodnoty. Z uvedeného vyplýva, že väčšina našich stád trpí chronickou subklinickou methemoglobinémiou. I keď ide o subklinický charakter ochorenia, nemožno jeho význam podceňovať. Už len vyradenie 10 % hemoglobínu z funkcie si vyžiada u výkonných dojnic kompenzačné zrýchlenie krvného obehu na úkor rezervnej energie, ktorá je takto stratená pre produkciu. Parciálna hypoxia proces ešte zvyrazňuje. U zvierat vyšetrených zo 140 maštalí (Žilková, 1983) bola vo viac ako polovici vzoriek methemoglobínémie nad 5 %.

Schipper a Alstead (1975) a Olejník (1978) popísali u prežúvavcov schopnosť návyku na zvyšujúce sa dávky prijímaných dusičnanov. Za hlavnú príčinu návyku sa považuje prispôsobovanie mikroflóry gastrointestinálneho traktu k narastajúcim dávkam dusičnanov v krmive (Kemp aj., 1976, 1977), pričom sa mikroflóra prispôsobuje ku zvýšenému príjmu dusičnanov už v priebehu 4–5 dní. Príčinou prispôsobenia sa mikroorganizmov je zrejme zvýšenie ich nitrátreduktázovej aktivity.

Skřivánek (1987) udáva, že príjem zvýšených dávok NO_3^- mal škodlivý vplyv na zdravotný stav teliat. Dlhodobý (až 53dňový) príjem KNO_3 vo zvyšujúcej sa dávke od 25 až po 450 $\text{mg NO}_3^- \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. mal za následok štatisticky nevýznamný pokles hmotnostných prírastkov.

Bouda aj. (1986) pri experimentálnej dusičnavej otrave taktiež zistili možnosť návyku na zvyšujúce sa dávky; 0,5 g $\text{NO}_3^- \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. u teliat na mliečnej výžive a 0,4 g $\text{NO}_3^- \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. u teliat na rastlinnej výžive vyvolali výrazný vzostup methemoglobínémie a vývoj klinických príznakov otravy.

Hnačky u teliat, ktorým sú podávané vyššie dávky NO_3^- môžu byť výsledkom lokálneho dráždenia mukózy tráviaceho traktu (Kühnert, 1981) a osmotického efektu (Bartík a Piskač, 1974).

Dagan aj. (1988) popisujú niekoľko prípadov prechodnej methemoglobínémie u hnačkových infantov, pričom bol u nich vylúčený príjem methemoglobintvorných látok. Methemoglobínémia môže byť sprievodným príznakom hnačky pri endogénnej produkcii dusičnanov alebo dusitanov bakteriálnymi pôvodcami hnačkového ochorenia (Hegesh a Schiloh, 1982) ako aj otrava dusičnanmi môže svojim vplyvom na osmotické pomery v gastrointestinálnom trakte vyústiť v hnačku.

V prvej časti práce sme sa zamerali na plošný prieskum methemoglobínémie u teliat a ich matiek v niektorých chovoch za bežných chovateľských podmienok. V experimentálnej časti sme sledovali dynamiku methemoglobínémie teliat po perorálnej aplikácii dusičnanu draselného v závislosti na dávke a veku teliat.

MATERIÁL A METÓDY

V piatich chovoch jedného okresu sme celkove vyšetrili 90 teliat v období mliečnej výživy, z toho 32 teliat (35,5 %) vykazovalo príznaky výraznej hnačky. Vek zvierat bol v priemere 7,5 dňa, najvyšší bol 18 dní. Mliečna výživa bola rôzna: mlieko vlastných matiek, zvyškové mlieko a staršie zvieratá boli krmené krmnou zmesou Laktavit v dennej dávke 6–7 l.

Ďalej sme vyšetrili 27 párov matka—teľa, kde priemerný vek teliat bol 2,5 dňa a teľatá boli kŕmené len mliekom, resp. materským mliekom voľným cicaním alebo pomocou cumľa po vydojení. Kravy aj v tomto prípade boli kŕmené bežným spôsobom (tab. I).

V experimentoch sme celkove u 27 teliat, resp. mladého dobytky v rôznom veku, aplikovali po 12hodinovej kŕmnej prestávke miesto mlieka, resp. krmiva pažerákovou sondou vo vodnom roztoku 0,3, resp. 0,15 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. (obr. 1, tab. I a III).

Krv sme odoberali z *v. jugularis* a hemolýzát sme pripravili zmiešaním 1 ml krvi s 20 ml destilovanej vody. Obsah methemoglobínu sme vyšetrili fotometricky pomocou kyanidu draselného (Veterinárne laboratórne vyšetrovacie metódy, 1983) najneskôr do dvoch hodín po odbere.

Štatistické výpočty boli prevedené Studentovým *t*-testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerný obsah methemoglobínu v krvi všetkých 90 vyšetrených teliat v bežných podmienkach chovu, hnačkujúcich i nehnačkujúcich (tab. I) bol 3,4 %, pričom maximálna zistená hodnota bola 16,4 % a minimálna 0,1 %. U nehnačkujúcich teliat bola priemerná hodnota Mthb 2,5 % a u hnačkujúcich teliat 4,9 %. Maximálna hodnota u nehnačkujúcich teliat bola 16,4 % a u hnačkujúcich teliat 10,1 %. Minimálna hodnota bola 0,1 % u nehnačkujúcich a 0,3 % u hnačkujúcich teliat. Rozdiely hodnôt u hnačkujúcich a nehnačkujúcich teliat boli významné na hladine významnosti 0,0005.

I. Koncentrácia Mthb (%) v krvi teliat a dojníc — Mthb concentrations (%) in the blood of calves and dairy cows

Skupina zvierat ¹	$\bar{x}$	$\pm S$	Koncentrácia ²		Priemerný vek ³		n
			min.	max.	dni ⁴	roky ⁵	
Všetky teľatá ⁶	3,4	2,98	0,1	16,4	7,5		90
Hnačkujúce teľatá ⁷	4,9	2,82	0,3	10,1	6,0		32
Zdravé teľatá ⁸	2,5	2,70	0,1	16,4	8,0		58
Dojnice ⁹	4,2	3,92	0,1	19,9		5	27
A ich teľatá ¹⁰	4,2	3,06	0,1	16,4	2,5		27

¹group of animals, ²concentration, ³average age, ⁴days, ⁵years, ⁶all calves, ⁷calves suffering from diarrhoeas, ⁸healthy calves, ⁹dairy cows, ¹⁰and their calves

Obsah methemoglobínu v priemernej hodnote dosiahol u matiek a teliat v podstate rovnakú úroveň 4,2 %. Maximálna hodnota methemoglobinémie u dojníc bola 19,9 % a u teliat 16,4 %, kým minimálna hodnota bola u oboch 0,1 %. Korelačný koeficient (0,147526) bol veľmi nízky a rozdiely hladín boli len na úrovni 0,5 % významnosti.

Perorálna jednorázová aplikácia 0,3 g KNO₃ · kg⁻¹ ž. h. v porovnaní s nultým odberom vyvolala výrazný vzostup tak individuálnych ako aj priemerných hodnôt methemoglobínu s kulmináciou v štvrtej hodine po aplikácii a následným poklesom na počiatočnú úroveň v 24. hodine (tab. II a obr. 1).

Klinické príznaky sa vo forme miernej psychomotorickej excitácie, tachypnoe, tachykardie a miernej cyanózy slizníc prejavili už o tretej, kulminovali v štvrtej hodine a vytratili sa do šiestej až osmej hodiny.

Obdobná tendencia, ale s nižšou intenzitou klinických príznakov a úrovňou methemoglobinémie bola zaznamenaná u všetkých troch vekových skupín experimentálnych zvierat pri dávke 0,15 g KNO₃ · kg⁻¹ živej hmotnosti.

II. Koncentrácia MtHb (%) u teliat (priemerný vek 35 dní) po p. o. aplikácii 0,3 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. — MtHb concentrations (%) in calves (average age of 35 days) after p. o. administration of 0.3 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ liveweight

Čas ¹ (h)	$\bar{x}$	$\pm S$	Koncentrácia ²		n
			min.	max.	
0	2,4	0,47	2,0	3,2	6
2	8,1	7,75	1,8	23,1	6
3	15,8	11,98	6,3	39,5	6
4	21,0	10,39	12,9	41,5	6
6	16,8	10,51	8,3	37,6	6
8	8,8	5,22	3,8	18,9	6
12	6,0	3,22	2,9	12,1	6
24	1,9	0,77	1,0	2,9	6

¹time, ²concentration

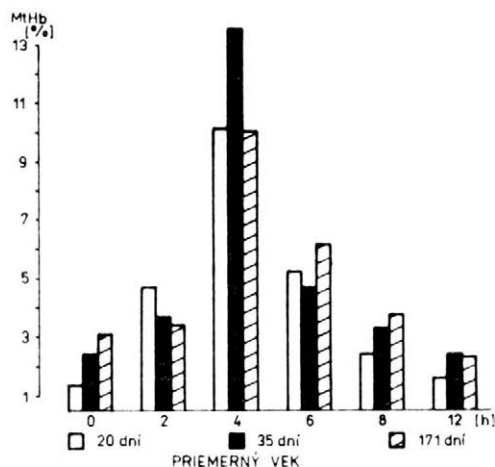
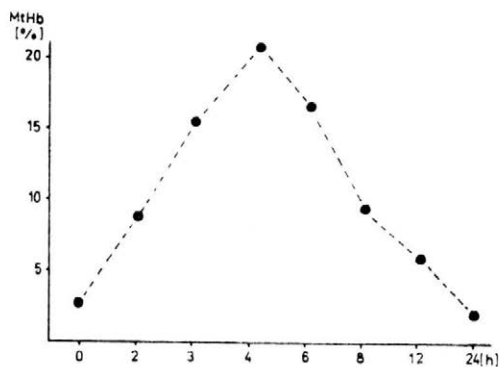
Vo všetkých skupinách bola v podstate zhodná dynamika methemoglobínémie, s rôznou intenzitou v skupinách, v priemerných hodnotách (tab. III, IV, V a obr. 2). Pri rovnakej dávke dusičnanu na kg ž. h. na vyslovene mliečnej výžive (vek 20 dní) a vyslovene na rastlinnej výžive (vek 171 dní) reagovali teľatá v podstate rovnako, kým teľatá na prechode z mliečnej do rastlinnej výživy (vek 35 dní) sme zaznamenali na vrchole najvýraznejšiu priemernú koncentráciu.

Pri celkovom zhodnotení methemoglobínémie z počtu 90 vyšetrených teliat bola koncentrácia methemoglobínu do 1 % len u 26 teliat (28,9 %). U zostávajúcich teliat bola methemoglobínémie od 1 do 3 % v 24 prípadoch, od 3 do 5 % v 11 prípadoch, čo predstavuje 32,2 %, v dvoch vyšetovaných vzorkách krvi bola koncentrácia methemoglobínu nad 10 % (tab. VI).

III. Koncentrácia MtHb (%) u teliat (priemerný vek 20 dní) po p. o. aplikácii 0,15 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. — MtHb concentrations (%) in calves (average age of 20 days) after p. o. administration of 0.15 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ liveweight

Čas ¹ (h)	$\bar{x}$	$\pm S$	Koncentrácia ²		n
			min.	max.	
0	1,4	0,49	0,6	2,1	10
2	4,7	1,96	2,0	8,3	10
4	10,1	2,74	7,0	15,5	10
6	5,3	2,41	2,5	10,0	10
8	2,5	1,12	1,0	5,1	10
12	1,6	0,38	1,0	2,0	10

For 1—2 see Tab. II



1. Dynamika koncentrácie methemoglobínu (% z celkového hemoglobínu) u teliat v priemernom veku 35 dní po p. o. aplikácii 0,3 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. — Dynamics of methaemoglobin concentrations (% out of the total haemoglobin) in calves at the average age of 35 days after p. o. administration of 0.3 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ liveweight

2. Dynamika koncentrácie methemoglobínu (% z celkového hemoglobínu) u teliat v priemernom veku 20, 35 a 171 dní po p. o. aplikácii 0,15 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. — Dynamics of methaemoglobin concentrations (% out of the total haemoglobin) in calves at the average age of 20, 35 and 171 days after p. o. administration of 0.15 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ liveweight

dní — days, priemerný vek — average age

U hnačkujúcich teliat bola methemoglobulinémia do 1 % v 15,6 % prípadov, od 1 do 3 % v 9,3 % prípadov, od 3 do 5 % v 12,5 % a nad 5 % v 62,6 % prípadov.

U zdravých teliat bola koncentrácia methemoglobínu do 1 % v 37,7 %, od 1 do 3 % v 41,4 %, od 3 do 5 % v 12 % a nad 5 % v 13,9 % prípadov.

IV. Koncentrácia Mthb (%) u teliat (priemerný vek 35 dní) po p. o. aplikácii 0,15 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. — Mthb concentrations (%) in calves (average age of 35 days) after p. o. administration of 0.15 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ liveweight

Čas ¹ (h)	$\bar{x}$	$\pm S$	Koncentrácia ²		n
			min.	max.	
0	2,5	1,60	0,4	5,4	7
2	3,7	1,70	1,5	6,0	7
4	13,7	12,81	3,9	42,1	7
6	4,7	1,69	2,0	7,5	7
8	3,3	1,13	1,9	5,3	7
12	2,4	1,05	1,1	4,3	7

For 1—2 see Tab. II

V. Koncentrácia MtHb (%) u teliat (priemerný vek 171 dní) po p. o. aplikácii 0,15 g KNO₃ . kg⁻¹ ž. h. — MtHb concentrations (%) in calves (average age of 171 days) after p. o. administration of 0.15 g KNO₃ . kg⁻¹ liveweight

Čas ¹ (h)	$\bar{x}$	$\pm S$	Koncentrácia ²		n
			min.	max.	
0	3,1	0,98	2,2	4,5	4
2	3,4	0,79	2,9	4,6	4
4	10,8	4,79	7,6	17,2	4
6	6,2	3,52	3,2	11,3	4
8	3,8	2,54	2,0	7,6	4
12	2,4	0,68	1,8	3,2	4

For 1—2 see Tab. II

VI. Rozloženie methemoglobínémie vo vyšetrenom súbore teliat (n = 90 ks) — Methaemoglobinaemia distribution in the investigated population of calves (n = 90 head)

	MtHb (%)	Počet teliat ¹	%
Všetky teľatá ²	do 1	26	28,9
	1—3	24	26,6
	3—5	11	12,2
	nad 5	29	32,2
Zdravé ³	do 1	19	32,7
	1—3	24	41,4
	3—5	7	12,0
	nad 5	8	13,9
Hnačkujúce ⁴	do 1	5	15,6
	1—3	3	9,3
	3—5	4	12,5
	nad 5	20	62,6

¹number of calves, ²all calves, ³healthy, ⁴suffering from diarrhoeas

Uvedený prehľad dáva určitú možnosť vyjadriť sa k fyziologickým, resp. patologickým normám, ktoré sa dosiaľ pohybujú na dvoch úrovniach: do 2 % MtHb (Bartík a Rosival, 1971) a do 5 % (Žilková, 1983).

Z prevedeného sledovania sa ukazuje, že prvá norma je príliš prísna a druhá norma je málo náročná.

Ako vidieť z nášho prehľadu zo zdravých teliat do 3 % MtHb možno začleniť takmer 75 % vyšetrených teliat. Do protikladu možno uviesť, že hnačkujúce teľatá, kde methemoglobínémia je spravidla len mierneho stupňa oproti intoxikáciám NO₃ iónom, vykazujú v 75 % prípadov methemoglobínémiu nad 3 %. S prihliadnutím aj na experimentálne výsledky sa zdá, že triezve rozhranie fyziologickej a patologickej methemoglobínémie sa pohybuje okolo 3 %.

Pozoruhodné výsledky sme zistili pri methemoglobínémii dojnic a ich novouliahnutých teliat v priemernom veku 2,5 dňa, kde boli hodnoty

v priemere i v individuálnych hodnotách v podstate rovnaké. Bližšie vzťahy uvádzame na inom mieste v súvislosti s transmamárnym prestupom NO_3^- iónu.

Výsledky našich vyšetrení v terénnych podmienkach sú obdobné ako uvádza Žilková (1983) v chovoch dospelého hovädzieho dobytká. Môžeme rovnako ako Lebeda a Kovařík (1978) konštatovať, že väčšina zvierat v našich bežných chovateľských podmienkach trpí chronickou subklinickou methemoglobinémiou.

Pri experimentálne vyvolanej methemoglobínemii sme podobne ako Skřivánek (1987) zaznamenali koncentrácie methemoglobínu s kulmináciou v tretej až štvrtej hodine po perorálnej aplikácii KNO_3 .

Na rovnakú dávku najvýraznejšie zareagovali methemoglobinémiou teľatá v priemernom veku 35 dní, teda v období prechodu z mliečnej na rastlinnú výživu. Je však pozoruhodné, že toto obdobie sa kryje s obdobím maximálne prehlbenej anémie teliat (Slanina, 1977), čo z hľadiska narušenia celkového zdravotného stavu môže mať u teliat osobitný význam. V tomto období spravidla vrcholí aj kritická imunobiologická fáza, kde kolostrálna imunita je už len prahová a vlastná imunopoéza ešte zaznamenáva postupný ontogenetický nárast. Táto skutočnosť je v súlade s tvrdením autorov Bouda aj. (1986), že teľatá na mliečnej výžive reagujú menej výrazne ako teľatá na rastlinnej výžive na perorálnu aplikáciu dusičnanov. Reakcia jednotlivých zvierat na rovnakú dávku KNO_3 sa líšila tak v klinických ako aj biochemických ukazovateľoch, čo sa odrazilo v značnom rozptyle individuálnych hodnôt methemoglobinémie. Na rozdielnu individuálnu citlivosť pri otrave NO_3^- iónmi poukazuje aj Skřivánek (1987) a Bouda aj. (1986).

Prevedené sledovania a experimentálne pokusy žiadajú nutne sa vyjadriť k toxickej dávke, resp. k dávke vyvolávajúcej klinické príznaky, k dobe stanovenia methemoglobinémie po prijatí dusičnanov, k významu latentnej methemoglobinémie a čiastočne k úrovni methemoglobinémie vyžadujúcej terapeutický zákrok.

Preskúšaná jednorázová dávka $0,15 \text{ g KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. vyvolala mierne, ale spoľahlivo zistiteľné klinické príznaky, kým dávka $0,3 \text{ g KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. vyvolala príznaky zreteľné, ktoré však ešte nevyžadovali terapeutický zákrok a vo všetkých prípadoch došlo spontánne k vymiznutiu prejavov do šiestej až osmej hodiny.

Zatiaľ nepublikované výsledky nami prevedených pokusov pri dávke $0,5 \text{ g KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. poukázali na veľmi výraznú formu methemoglobinémie ohrozujúcu život a vyžadujúcu nutný terapeutický zákrok. Teda dávku $0,5 \text{ g KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. treba pokladať za toxickú, kým $0,3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. za výstražnú.

Zdá sa, že latentná, resp. subklinická forma methemoglobinémie, prípadne veľmi mierna, často zanedbateľná klinická forma methemoglobinémie zohráva najvážnejší význam v patogenéze chorôb teliat vzhľadom k jej vysokej prevalencii. Špeciálne u teliat v súvislosti s ontogenetickým dozrievaním organizmu hrá s veľkou pravdepodobnosťou obdobie prechodu z mliečnej výživy na rastlinnú závažnú úlohu.

Rýchla dynamika methemoglobinémie po prijatí dusičnanov vyžaduje časovo úzko ohraničenú dobu odberu krvi v rozmedzí dve až osem hodín po prijatí.

Literatúra

- BARTÍK, M. — PISKAČ, A. a kol.: Veterinární toxikologie. Praha, SZN 1974.
- BARTÍK, M. — ROSIVAL, I.: Dusičnany a močovina vo výžive zvierat. 1. vyd., Bratislava, Príroda 1971.
- BOUDA, J. — JAGOŠ, P. — SKŘIVÁNEK, M. — MUŽÍK, J. — ŠUPÁKOVÁ, D.: Origin and course of methaemoglobinemia in calves. Acta veter. (Brno), 55, 1986, s. 273—283.
- DAGAN, R. — ZALSTEIN, E. — GORODISCHER, R.: Methaemoglobinemia in young infants with diarrhoea. Eur. J. Pediat., 147, 1988, s. 87—89.
- HEGESH, E. — SCHILOAH, J.: Blood nitrates and infantile methaemoglobinemia. Chin. Chim. acta, 125, 1982, s. 107—116.
- KEMP, A. — GEURINK, J. H. — HAALSTRA, R. T. — MALESTEIN, A.: Nitrate poisoning in cattle 1. Discolouration of the vaginal mucous membrane as aid of prevention of nitrate poisoning in cattle. Stikstof, 19, 1976, s. 40—48.
- KEMP, A. — GEURINK, J. H. — HAALSTRA, R. T. — MALESTEIN, A.: Nitrate poisoning in cattle. 2. Change in nitrate in rumen fluid and methaemoglobin formation in blood after high nitrate intake. Netherl. J. agric. Sci., 25, 1977, s. 51—62.
- KÜHNERT, M. von: Neuere Erkenntnisse der Nitrat/Nitrit und Amoniak-Vergiftung bei Wiederkäuern. Mh. Veter. Med., 36, 1981, s. 34—36.
- LEBEDA, M. — KOVARÍK, K.: Chronická methemoglobinémia dojnic. Veterinářství, 28, 1978, s. 62—64.
- OLEJNÍK, Z. G.: Diagnostika, profilaktika i liečenie otrávenij sel'sko-chozjajstvennyh životnyh nitratami i nitritami. Nauč. Tr. sel. Choz., 210, 1978, s. 99—102.
- SCHIPPER, J. A. — ALSTEAD, A. D.: Nitrate poisoning of North Dakota Livestock. 1. vyd., Fargo, Cooper, Extern Service North Dakota State Univ., 1975.
- SKŘIVÁNEK, M.: Studium změn zdravotního stavu a vybraných klinicko-biochemických ukazatelů při experimentálních methemoglobinémiích telat. (Kandidátská disertace.) 1987. — Vysoká škola veterinární.
- SLANINA, L.: Zdravie a produkcia teliat. Bratislava, Príroda 1977.
- Veterinárne laboratórne vyšetrovacie metódy. Bratislava, 1983.
- ŽILKOVÁ, J.: Výskyt methemoglobinu v krvi skotu. Veterinářství, 33, 1983, s. 154—155.

Došlo dňa 9. 1. 1990

SLANINA, L. — SLIVKA, P. — STRUHÁRIKOVÁ, J. — ELBERTOVÁ, A. — CHANDOGA, P. (Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice; University of Veterinary Medicine, Košice; Experimental Research Centre, Zemplínska Teplica): *Methaemoglobinaemia in calves, mainly in the dam — calf relation and after experimental application of nitrates*. Veter. Med., (Praha), 36, 1991: 1—8.

A field investigation of methaemoglobinaemia was performed in healthy calves and in calves suffering from diarrhoeas at different age periods; methaemoglobinaemia of dairy cows and their newborn calves was examined at the average age of 2.5 days. In the other part of this study, NO_3^- ion was administered experimentally per os to the calf organisms at doses of 0.15 and 0.3 g $\text{KNO}_3 \cdot \text{kg}^{-1}$ liveweight; this treatment induced a low to medium degree of clinical methaemoglobinaemia. The results of this study indicate that it is possible to comment on the physiological standard of methaemoglobinaemia (less than 3 % MaHb) in the total haemoglobin, urgent time of methaemoglobin detection after nitrate intake (2 to 8 h) with respect to the fast dynamics of nitrates, and the importance of subclinical form of methaemoglobinaemia and its relationship to the ontogenetic development of piglets.

blood; methaemoglobinaemia; toxicity; dairy cow; calf; nitrates; nitrites

Adresy autorov:

Prof. MVDr. Ludovít Slanina, DrSc., Vysoká škola veterinárska, Komenského 73, 041 81 Košice
 MVDr. Peter Slivka, MVDr. Jana Struháriková, MVDr. Pavol Chandoga, Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Duklianských hrdinov 1/A, 040 01 Košice
 MVDr. Alica Elbertová, Experimentálne výskumné stredisko, 075 01 Zemplínska Teplica

VÝSKYT STAFYLOKOKOVÝCH DRUHŮ U KLINICKY ZDRAVÝCH HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT

B. Skalka

SKALKA, B. [Vysoká škola veterinární, Brno]: *Výskyt stafylokokových druhů u klinicky zdravých hospodářských zvířat*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (1): 9–19.

Výskyt stafylokokových druhů u zdravých zvířat se sledoval metodou selektivní izolace kmenů u mladých a dospělých jedinců skotu, u prasat a kura domácího. Z 6 066 vzorků se zachytilo 4 567 kmenů, které zahrnovaly všechny známé druhy, mimo *Staphylococcus caseolyticus*, *S. saccharolyticus*, *S. schleiferi* a *S. lugdunensis*. Zařazení do druhu se nezdařilo u 3,8 % kmenů. Vzorky na vyšetření se odebíraly po jatečném odporažení vyšetřovaných zvířat, jen u telat se vyšetřovaly intravitálně odebrané výtěry tonzil. Nejčastěji izolovanými druhy z tkáně tonzil dospělého skotu byly *S. aureus* (19,9 %), *S. saprophyticus* (12,4 %), *S. hyicus* (8,8 %) a *S. hominis* (8,6 %), zatím co z tkáně plic to byly *S. saprophyticus* (28,8 %), *S. cohnii* (10,6 %) a *S. epidermidis* (10,2 procenta) a z parenchymu mléčné žlázy *S. saprophyticus* (17,4 %), *S. xylosus* (13,1 %) a *S. epidermidis* (10 %). V tkáni tonzil prasat byl *S. aureus* zastoupen 44,5 % a *S. hyicus* 31,8 % a v jejich plících byly nejčastěji zjištěny druhy *S. aureus* (20,6 %), *S. saprophyticus* (12,3 %), *S. hyicus* (12,1 %) a *S. epidermidis* (11,5 %). U kura domácího se nejčastěji vyskytovaly *S. epidermidis* (23,7 procenta), *S. gallinarum* (16,5 %) a *S. aureus* (15,4 %). U telat byl nejčastěji izolován *S. xylosus* (37 %), *S. saprophyticus* (19,2 %) a *S. cohnii* (15,2 %). Ostatní stafylokokové druhy se u vyšetřovaných zvířat vyskytovaly v nízkých procentních hodnotách.

skot; prase; kur domácí; frekvence stafylokokových druhů; selektivní izolace stafylokoků

Rozdělení stafylokoků, v převážné většině koagulázanegativních, do nových druhů zahájily studie autorů Kloos a Schleifer (1975) a Schleifer a Kloos (1975), vesměs reklasifikací původních typů druhů *S. epidermidis* a *S. saprophyticus*. K jejich návrhům se později připojovaly další, určující nové druhy jak na podkladě reklasifikace některých mikrokoků (Devriese, 1977; Kilpper-Bälz a Schleifer, 1981; Schleifer aj., 1982), tak i určením zcela nových druhů stafylokoků (Hájek, 1976; Schleifer a Fischer, 1982; Devriese aj., 1983; Kloos a Schleifer, 1983; Schleifer aj., 1984), anebo povýšením některých poddruhů na samostatný druh (Schleifer aj., 1983; Hájek aj., 1986). Oficiálním uvedením v systematice bakterií (Kloos a Schleifer, 1986) se však růst počtu

stafylokokových druhů neuzavřel, jak pro to svědčí návrh autorů Freney aj. (1988). S uvedenými skutečnostmi se pojí nutnost znalostí možného výskytu nově určených druhů stafylokoků v organismech různých hostitelů. Průkopnickými pracemi v této oblasti jsou studie autorů Kloos aj. (1976a; 1976b), sledující distribuci stafylokokových druhů na kůži lidí a zvířat. Zájem lékařské bakteriologie v oblasti koagulázanegativních stafylokoků se zaměřuje především na určení vztahu mezi izolovaným druhem a onemocněním hostitele, což shrnují některá souborná pojednání (Fleer a Verhoef, 1984; Gemmel, 1986; 1987; Gahrn — Hansen, 1987; Pulverer aj., 1987). V řadě prací veterinární bakteriologie se sleduje spektrum výskytu koagulázanegativních druhů především v sekretu zdravé i nemocné mléčné žlázy skotu (Devriese, 1979; Devriese a Keyser, 1980; Park a Cho, 1983; Watts aj., 1984; 1986; Langlois aj., 1984; Devriese aj., 1985; Rather aj., 1986; Boddie aj., 1987; Hirata aj., 1987; Hogan aj., 1987; Watts a Owens, 1987; Harmon a Langlois, 1989). Existují však i studie zaměřené na cílené sledování koagulázanegativních stafylokokových druhů u jiných zvířat než skotu (Poutrel, 1984; Cox aj., 1984; 1985; 1988; Devriese aj., 1984/85, 1985; Jensen aj., 1987; Shimizu aj., 1987; Harvey a Gilmour, 1988). Citovaní autoři dosahovali dost rozdílné výsledky. Některé z nich uvádí tab. I.

Předloženou studií chceme přispět k dosavadním znalostem o výskytu druhů koagulázanegativních stafylokoků u některých animálních hostitelů. Zaměřili jsme se na sledování této tematiky u klinicky zdravých zvířat významných pro člověka jako zdroj živočišné bílkoviny.

MATERIÁL A METODY

VYŠETŘOVANÉ VZORKY

Pro studii jsme zvolili vyšetření dospělých jedinců skotu a prasat, dále brojery kura domácího a telata. Vzorky na vyšetření se odebíraly z tkáně tonzil skotu a prasat, z plic skotu, prasat a kura domácího a z parenchymu mléčné žlázy skotu. Vyšetřovala se klinicky zdravá zvířata a vzorky se odebíraly po jejich odporažení na jatkách. Telata se vyšetřovala intravitálně a ke kultivacím se použily výtěry povrchu tonzil. Celkem bylo vyšetřeno 920 kusů skotu, 821 prasat, 390 kusů kura domácího a 1385 telat.

IZOLACE STAFYLOKOKOVÝCH KMENŮ

Odebraný materiál z uvedených zdrojů se kultivoval do tekutého média. Základem byl živný bujón č. 1 IMUNA, doplněný 7,5 % NaCl, kyselinou nalidixovou 15 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a kolistinem 10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Po inkubaci 24 h a 48 h při teplotě 37 °C se z této půdy, technikou izolace na jednu kolonii, kultivovalo na pevné médium. Pro jeho přípravu byl použit základ pro krevní agar č. 4 IMUNA, doplněný 5 % defibrinované ovčí krve. Nárůst se hodnotil po 24 h a 48 h inkubace při teplotě 37 °C a izolované kolonie stafylokoků se použily pro diagnostiku druhu.

DIAGNOSTICKÉ TESTY

Pro diagnostické zařazení izolovaných kmenů se zjišťovala jejich aktivita koagulažová, fibrinolytická, hemolytická, proteolytická a lipolytická, dále hydrolýza argininu a urey, produkce shlukovacího faktoru, pigmentu, hyaluronidázy, acetoinu a fosfatázy, aerobní produkce kyseliny v maltóze, manitu, mannóze, rafinóze, sacharóze, turanóze, xylóze, trenalóze redukce nitrátů a citlivost novobiocinu. Pro uvedené testy se použila konvenční metoda. Určené kmeny *S. aureus* se biotypizovaly podle doporučení, které publikoval Devriese (1984).

I. Spektrum stafylokokových druhů u hospodářských zvířat zjištěné některými autory (hodnoty v %) — The spectrum of staphylococcus species in farm animals determined by some researchers (values in %)

Autor ¹	D(1)	W		D(2)		B	S
Rok publikace ²	1980	1984		1985		1987	1987
Vyšetřovaný vzorek ³	skot ⁷ , mléčná žláza ⁸	skot ⁷ , mastitidní sekret ⁹	skot ⁷ , kůže ¹⁰ , mléko ¹¹	prase ¹² , kůže ¹⁰ , domácí nozdry ¹³	kur domácí ¹⁴ , kůže ¹⁰ , nozdry ¹³	skot ⁷ , mléčná žláza ⁸	prase ¹² , tonzily ¹⁵
Počet vzorků ⁴	228	N	N	N	N	992	126
Počet stafylokokových kmenů ⁵	387	179	189	120	190	665	228
<i>Staphylococcus aureus</i>	N	40,8	N	N	N	11,7	25,0
<i>intermedius</i>	N	6,1	N	N	N	0	0
<i>hyicus</i>	2,6	6,1	4,7	6,6	16,3	17,4	40,6
<i>carneus</i>	×	0	0	0	0	0	0
<i>caprae</i>	×	0	0	0	0	0	0
<i>chromogenes</i>	4,7	11,7	11,6	16,7	5,2	48,7	0,3
<i>epidermidis</i>	14,5	5,0	29,1	0	2,1	0	1,4
<i>auricularis</i>	×	0	0	0	0	0	0
<i>haemolyticus</i>	13,2	2,8	9,5	4,2	3,2	0	0,7
<i>capitis</i>	0,2	0	0	0	0	0	0
<i>simulans</i>	0,8	17,9	7,4	4,2	3,2	0,8	9,7
<i>warneri</i>		3,4	6,9	2,5	0	4,4	0
<i>hominis</i>	*11,9	0	0	0	0	0	17,7
<i>saprophyticus</i>	0	0,5	1,6	0	2,1	0	0
<i>cohnii</i>	2,6	0,5	6,3	2,5	4,7	0	0
<i>xylosum</i>	27,0	2,2	10,1	9,2	11,1	13,1	1,0
<i>equorum</i>	×	×	0	0	0	0	0
<i>arlettae</i>	×	×	0	0	0	0	0
<i>gallinarum</i>	×	0	0	0	11,1	0	0
<i>sciuri</i>	16,0	1,1	2,6	21,7	8,9	3,9	0
<i>lentus</i>	×	0	9,0	26,6	28,4	0	0
<i>kloosii</i>	×	×	0	0	0	0	0
Nezařazené do druhu	6,5	1,7	1,1	5,8	3,7	0	3,5

¹author, ²year of publication, ³test sample, ⁴number of samples, ⁵number of staphylococcus strains, ⁶unidentified species, ⁷cattle, ⁸mammary gland, ⁹mastitis-infected secretion, ¹⁰skin, ¹¹milk, ¹²pig, ¹³nostrils, ¹⁴domestic fowl, ¹⁵tonsils

D(1) = Devriese a Keyser (1980); W = Watts aj. (1984); D(2) = Devriese aj. (1985); B = Boddie aj. (1987); S = Shimizu aj. (1987)

N = neuvedeno; × = v době publikace nebyl druh známý; * = *S. warneri* a *S. hominis* uvedeny společně jako skupina M — N = not given; × = at the time of paper publication this species was not known; * = *S. warneri* and *S. hominis* cited together as group M

VÝSLEDKY

V průběhu čtyřleté studie jsme vyšetřili celkem 6 066 vzorků a pro další sledování jsme získali 4 567 stafylokokových kmenů. Z tohoto počtu se do druhu *S. aureus* řadilo 704 (15,4 %), do druhu *S. intermedius* pouze sedm (0,2 %) a do třetího koagulázapozitivního druhu *S. hyicus* 415

(9,1 %) kmenů. Ke koagulázanegativním stafylokokům senzitivním k novobiocinu náleželo 1 158 (25,3 %) kmenů a k druhům rezistentním na novobiocin to bylo 2 113 (46,2 %) kmenů. Spolehlivé zařazení do známých stafylokokových druhů se nezdařilo u 173 (3,8 %) stafylokokových kmenů, vesměs koagulázanegativních. S výjimkou *S. caseolyticus*, *S. saccharolyticus*, ale i zcela nově popsaných druhů *S. schleiferi* a *S. lugdunensis*, se nám zdařila izolace všech existujících stafylokokových druhů, i když s vysokou variabilitou jejich výskytu v různých vzorcích a od různých hostitelů.

Vyšetřením 2 666 vzorků ze skotu se zachytilo celkem 1 332 stafylokokových kmenů. Nejpočetnější byla skupina koaguláza negativních stafylokoků rezistentních k novobiocinu, zahrnující 536 (40,2 %) kmenů. Nejpočetněji zastoupen byl *S. saprophyticus*, a to 254 kmeny, což představuje 47,4 % v rámci této skupiny. Jen o málo menší než předchozí skupina byla skupina koagulázanegativních druhů senzitivních k novobiocinu, reprezentovaná 497 (37,3 %) kmeny. Nejpočetnějším druhem v této skupině byl *S. epidermidis*, zahrnující 120 kmenů, což představuje 24,1 % kmenů této skupiny a druhým co do početnosti byl *S. hominis*, jehož 105 kmenů reprezentuje 21,1 % této skupiny. *S. aureus* byl zastoupen 164 kmeny (12,3 %) a 77 (5,6 %) kmenů náleželo druhu *S. hyicus*. *S. intermedius* se izoloval pouze jednou a 60 (4,5 %) kmenů nebylo možné druhově zařadit. Výsledky z jednotlivých orgánů jsou poněkud odlišné od sumárního hodnocení. Z tonzil se izolovalo 547 kmenů s nejpočetnějším zastoupením skupinou koagulázanegativních, novobiocinsenzitivních druhů, a to 217 (39,6 %) kmeny. V rámci této skupiny byly nejfrekventnějšími druhy *S. hominis*, *S. epidermidis* a *S. chromogenes*, zahrnující 21,6 %, 18,9 % a 17,9 % jejich kmenů. Skupina koagulázanegativních, novobiocinrezistentních druhů zahrnovala 151 (27,6 %) kmenů. V této skupině byl nejpočetněji zastoupen *S. saprophyticus*, a to 68 kmeny, což představuje 45 % jejich kmenů. *S. aureus* reprezentovalo 109 (19,9 %) kmenů, *S. hyicus* 48 (8,8 %) a *S. intermedius* nebyl izolován. 22 (4 %) kmenů se nezdařilo druhově určit. Ve vzorcích z plic se izolovalo 434 kmenů. Nejpočetnější skupinu s 218 (50,2 %) kmeny tvořily koagulázanegativní, novobiocinrezistentní druhy. *S. saprophyticus* svými 125 (57,3 %) kmeny výrazně převyšoval počty ostatních druhů této skupiny. 150 (34,6 %) kmenů bylo koagulázanegativních, senzitivních k novobiocinu. Nejpočetněji byly zastoupeny kmeny *S. epidermidis* (44), *S. haemolyticus* (35) a *S. hominis* (32), což představuje 29,3 %, 23,3 % a 21,3 % kmenů této skupiny. 27 (6,2 %) náleželo druhu *S. aureus*, 14 (3,2 %) k *S. hyicus* a jednou (0,2 %) byl izolován *S. intermedius*. Druhově zařazeno nebylo 24 (5,5 %) kmenů. Z parenchymu mléčné žlázy bylo izolováno 351 kmenů. Nejpočetněji byly zastoupeny koagulázanegativní, novobiocinrezistentní druhy, a to 167 (47,6 %) kmeny. Z nich byly nejvíce frekventní *S. saprophyticus* (61) a *S. xylosus* (46), což představuje 36,5 % a 27,5 % kmenů této skupiny. 130 (37 %) kmenů bylo koagulázanegativních, novobiocinsenzitivních. Z této skupiny byly nejvíce zastoupeny *S. epidermidis* 35 (26,9 %) kmeny a *S. hominis* 26 (20 procent) kmeny. 28 (8 %) kmenů náleželo druhu *S. aureus*, 12 (3,4 %) *S. hyicus* a 14 (3,9 %) kmenů nebylo možné druhově zařadit.

Z 1 625 vzorků z prasat bylo izolováno 1 363 stafylokokových kmenů a z tohoto počtu bylo 843 kmenů izolováno z tonzil a 520 z plic. Nejpo-

četnějším druhem, reprezentovaným 482 (35,3 %) kmeny, byl *S. aureus*. Na druhém místě byl *S. hyicus* s 331 (24,2 %) kmeny a téměř stejný byl počet koagulázanegativních, novobiocinsenzitivních druhů, zahrnujících 328 (24,1 %) kmenů. V této skupině byly nejvíce zastoupeny *S. chromogenes* a *S. epidermidis*, reprezentující 6,1 % a 6 % kmenů skupiny. 183 (13,4 %) kmenů bylo koagulázanegativních a rezistentních k novobiocinu. Nejfrekventnější byl *S. saprophyticus* s 82 (44,8 %) kmeny a stejně početně, a to po 39 (po 21,3 %) kmenech byly zastoupeny *S. cohnii* a *S. xylosus*. Pouze dvakrát (0,1 %) byl izolován *S. intermedius* a neurčených zůstalo 27 (2,7 %) kmenů. Různé však byly výsledky vyšetření obou tkání. 375 (44,4 %) kmenů *S. aureus* izolovaných z tonzil představovalo nejpočetnější skupinu a *S. hyicus* s 268 (31,8 %) byl druhým nejčastěji izolovaným druhem. 140 (16,6 %) kmenů náleželo ke koagulázanegativním, novobiocinsenzitivním druhům, nejčastěji reprezentovaných 52 (37,1 %) kmeny *S. chromogenes*. 39 (4,6 %) kmenů bylo koagulázanegativních, novobiocinrezistentních a z nich byl nejvíce zastoupen *S. saprophyticus* 18 (46,1 %) kmeny. Pouze jednou byl izolován *S. intermedius* a 20 (2,4 %) kmenů zůstalo neurčeno. 188 (36,1 %) kmenů koagulázanegativních, novobiocinsenzitivních představovalo největší skupinu stafylokoků ze vzorků z plic. V této skupině byl nejpočetněji zastoupen *S. epidermidis* 60 (31,9 %) kmeny. 144 (27,8 %) kmenů náleželo do skupiny koagulázanegativních stafylokoků, rezistentních k novobiocinu a z nich byl nejpočetnější *S. saprophyticus* svými 64 (44,4 %) kmeny. *S. aureus* shrnoval 107 (20,6 %) kmenů a *S. hyicus* 63 (12,11 %). Jen jednou byl izolován *S. intermedius* a do známých druhů se nezařadilo 17 (3,2 %) kmenů.

Ze vzorků z kura domácího se izolovalo 304 stafylokokových kmenů a nejpočetnější byla skupina koagulázanegativních, novobiocinsenzitivních druhů, představovaná 141 (46,4 %) kmeny. Největší podíl z nich náležel *S. epidermidis*, jehož 72 kmenů znamenalo 51 % v rámci této skupiny. Ve skupině koagulázanegativních, novobiocinrezistentních stafylokoků bylo 90 (29,6 %) kmenů a nejpočetnější zastoupení zde připadlo 50 (55,5 %) kmenům *S. gallinarum*. K *S. aureus* se řadilo 47 (15,6 %) kmenů, k *S. hyicus* devět (3 %) kmenů, jednou byl izolován *S. intermedius* a 16 (5,3 %) kmenů nebylo možné druhově zařadit.

Z 1385 výtěrů tonzil telat bylo izolováno 1568 stafylokokových kmenů. Skupina koagulázanegativních druhů, rezistentních k novobiocinu, zahrnovala 1304 (83,1 %) kmenů a převyšovala tak ostatní skupiny. Nejpočetněji v ní byl zastoupen *S. xylosus*, a to 580 (44,5 %) kmeny. 192 (12,2 %) kmenů druhé skupiny koagulázanegativních stafylokoků bylo reprezentováno zejména 44 (22,9 %) kmeny *S. epidermidis* a téměř stejnými počty *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* a *S. hominis*. Rovněž bylo izolováno osm kmenů *S. aureus*, tři kmeny *S. intermedius* a jeden kmen *S. hyicus*. Zařazení do známých druhů se nezdařilo u 60 (3,8 %) kmenů.

Celkový přehled výsledků dosažených v předložené studii podává tab. II.

DISKUSE

Záměrem předložené studie bylo získat co největší spektrum stafylokokových druhů z vyšetřovaného materiálu. Skutečnost, že jsme izolovali převážnou většinu známých stafylokokových druhů, a to i těch, je-

jichž izolaci neuvádějí jiná sdělení, sledující podobnou tematiku, svědčí jako pro splnění našeho záměru, tak i pro vhodnost použité metody. Zdařila se nám izolace *S. auricularis* a *S. capitis*, považovaných za typicky humánní kmeny, dále *S. carnosus*, jehož výskyt v animálních zdrojích se sice nepopírá [Kloos a Schleifer, 1986], ale nepopisuje v námi citovaných studiích, rovněž druhů *S. gallinarum*, *S. equorum*, *S. arlettae* a *S. kloosii*, jejichž výskyt vesměs pozorovali pouze autoři těchto druhů [Devriese aj., 1983; Schleifer aj., 1984], kteří je popsali jako typicky animální druhy. I když náš záchyt těchto druhů byl,

II. Zjištěné spektrum stafylokokových druhů u některých hospodářských zvířat (hodnoty v %) — The spectrum of staphylococcus species determined in some farm animals (values in %)

Druh zvířete ¹	Skot ⁶			Prase ⁷		Kur domácí ⁸	Tele ⁹
Orgán ²	tonzily ¹⁰	plíce ¹¹	mléčná žláza ¹²	tonzily ¹⁰	plíce ¹¹	plíce ¹¹	tonzily ¹⁰
Počet vzorků ³	905	920	841	821	804	390	1 385
Počet stafylokokových kmenů ⁴	547	434	351	843	520	304	1 568
<i>Staphylococcus</i> A	0,7	0	0	0,5	0,6	0,3	0
B	0,4	0	0,3	29,5	11,2	13,8	0
<i>aureus</i> C1	6,6	1,8	5,4	2,0	1,9	0	0
C2	12,2	4,4	2,3	12,5	6,9	1,3	0,5
<i>intermedius</i>	0	0,2	0	0,1	0,2	0,3	0,2
<i>hyicus</i>	8,8	3,2	3,4	31,8	12,1	3,0	0,06
<i>carnosus</i>	0,4	0,2	0,3	0,1	0	0	0
<i>caprae</i>	0,9	0,9	0,6	0,7	1,5	1,6	0
<i>chromogenes</i>	7,1	1,8	4,3	6,2	6,0	3,0	2,7
<i>epidermidis</i>	7,5	10,2	10,0	2,6	11,5	23,7	2,8
<i>auricularis</i>	0,4	0	0	0	0,4	0,3	0
<i>haemolyticus</i>	4,9	8,1	5,1	1,7	6,3	3,6	2,7
<i>capitis</i>	1,8	1,6	2,3	0	0,6	2,0	0,1
<i>simulans</i>	5,3	2,1	3,1	1,9	2,5	1,0	0,7
<i>warneri</i>	2,7	2,3	3,9	0,8	2,3	3,0	0,6
<i>hominis</i>	8,6	7,4	7,4	2,6	5,0	8,2	2,6
<i>saprophyticus</i>	12,4	28,8	17,4	2,1	12,3	3,6	19,2
<i>cohnii</i>	4,4	10,6	8,8	0,9	6,0	1,3	15,2
<i>xylosus</i>	6,8	5,5	13,1	0,8	6,2	4,6	37,0
<i>equorum</i>	0	0	0,3	0	0	0	0,06
<i>arlettae</i>	0	0	0	0	0	0	0,4
<i>gallinarum</i>	0,2	0,2	0	0,2	0,2	16,5	0,9
<i>sciuri</i>	3,6	4,6	7,1	0,5	2,7	3,0	9,6
<i>lentus</i>	0	0,4	0,6	0	0	0,6	0,3
<i>kloosii</i>	0,2	0	0,3	0	0,4	0	0,4
Nezařazené do druhu ⁵	4,0	5,5	3,9	2,4	3,2	5,3	3,8

¹animal species, ²organ, ³number of samples, ⁴number of staphylococcus strains, ⁵undetermined with any species, ⁶cattle, ⁷pig, ⁸domestic fowl, ⁹calf, ¹⁰tonsils, ¹¹lungs, ¹²mammary gland

až na nečetné výjimky, pouze v promilových hodnotách, podporují naše výsledky názor, že jejich možný výskyt u animálních hostitelů nelze apriorně odmítat.

Námi zvolená metoda znamenala možnost zachytu stafylokoků i při jejich nepatrných množstvích ve vyšetřovaných vzorcích. Doplnění pomnožovací půdy látkami potlačujícími růst jiných bakterií se osvědčilo, i když ojediněle docházelo ke kontaminaci některými streptokoky, bacily, protey nebo pseudomonádami, což znemožnilo další vyšetřování. Nelze rovněž vyloučit možnost bakteriostatického účinku složení média na některé velmi citlivé stafylokokové kmeny. Nedomníváme se však, že by takový efekt mohl podstatně ovlivnit naše výsledky.

V předložené studii jsme nehodlali sledovat otázky možného etiologického významu jednotlivých stafylokokových druhů. Jednak jsme se zaměřili na vyšetřování klinicky zdravých jedinců, jednak si uvědomujeme, že pro řešení takové problematiky je nutné zvolit metodu kvantitativního určení výskytu ve vyšetřovaném vzorku, což zdůrazňují i jiní autoři (Devriese a Keyser, 1980; Boddie aj., 1987; Hogan, 1987; Harmon a Langlois, 1989). Za určitou formu kvantitativního vyšetření lze považovat přímou kultivaci materiálu na pevné médium, nikoliv použití námi zvolené metody.

Detailní diagnostika koagulázanegativních stafylokokových druhů se pojí s rizikem diagnostických omylů, ať již se použije některý z komerčních souborů testů nebo konvenční metoda (Langlois aj., 1984; Watts aj., 1984; 1986; Cox aj., 1984; Rather aj., 1986; Gahrn-Hansen, 1987). Je rovněž náročná časově i ekonomicky (Cox aj., 1984). Z těchto důvodů někteří autoři diagnostikují jako druh pouze část z celkového počtu izolovaných kmenů (Langlois aj., 1984; Jensen aj., 1987).

Z hlediska procenta nezařaditelných kmenů je naše zjištění průměrné nezařaditelnosti 3,8 % srovnatelné s výsledky většiny citovaných autorů. Mnohem větší procento nezařaditelných kmenů popisují Kloos aj. (1976a; 1976b) 44 %, Devriese aj. (1984/85) 19 %, Hogan aj. (1987) 15,6 %, Park a Cho (1983) 13,2 %, Poutrel (1984) 10,1 procenta. Někteří autoři se domnívají, že další sledování nezařaditelných kmenů může rezultovat v určení nových druhů (Kloos aj., 1976a; 1976b; Devriese aj., 1984/85), jiní vysvětlují nemožnost zařazení do druhu variabilitou kmenů i určitou limitací spolehlivosti souborů diagnostických testů (Rather aj., 1986; Hogan aj., 1987).

Není zcela snadné konfrontovat naše výsledky s popisy jiných autorů. To vyplývá z rozdílnosti vyšetřovaných vzorků, z diferencí izolačních a diagnostických metod a v neposlední řadě i z rozdílů v technologiích chovů vyšetřovaných hostitelů. Domníváme se však, že i vzdor těmto rozdílům je určité srovnání možné, zejména při zaměření se na nejvýznamnější shody nebo rozdíly dosahovaných výsledků.

Pokud autoři vyšetřovali vzorky z mastitid skotu, izolovali *S. aureus* až ve 40,8 % (Watts aj., 1984; 1986), zatímco při vyšetření sekretu normální mléčné žlázy skotu zjišťovali tento druh v 11,4 % (Langlois aj., 1984) nebo ve 12 % (Hirata aj., 1987; Boddie aj., 1987), což se blíží našemu zjištění 8% výskytu. Naš záchyt tohoto druhu v tonzylách prasat však převyšuje údaj autorů Shimizu aj. (1987) o 25% pozitivitě výskytu.

Zanedbatelné počty izolací *S. intermedius* z námi vyšetřovaných zdrojů odpovídají údajům většiny citovaných autorů. Pouze Watts aj. (1984) popisují izolaci tohoto druhu z mléčné žlázy skotu v 6,1 % a v následné studii (1986) v 3,1 %. Popisy 88,6% a 40,2% výskytu *S. intermedius* u psů (Cox aj., 1984; 1988) a 13,5 % u koček (Cox aj., 1985), stejně jako 10,9 % u koní (Devriese aj., 1984/85), svědčí pro vyhraněnou afinitu tohoto druhu k určitým hostitelům.

Naše nálezy *S. hyicus* u sledovaných druhů zvířat se jen nepatrně liší od dříve publikovaných výsledků (Skalka, 1988). V mléčné žláze skotu izolovali tento druh častěji než my Watts a Owens (1987) v 44,2 %, Watts aj. (1986) v 30,8 % a Boddie aj. (1987) v 17,4 %. Langlois aj. (1984) uvádí 22% a Harmon a Langlois (1989) dokonce 58,8% pozitivitu, ale tito autoři nediferencovali mezi *S. hyicus* a *S. chromogenes*. Park a Cho (1983) a Hirata aj. (1987) nezachytili ani jednou *S. hyicus* z mléčné žlázy skotu. Shimizu aj. (1987) izolovali tento druh z tonzil prasat ve 40,6 %, což je vyšší hodnota než naše, která odpovídá 31,8 %. U kura domácího izolovali Devriese aj. (1985) tento druh v 16,3 %, zatímco náš nález byl 3 %.

Rozdíly existují i mezi našimi nálezy a popisy autorů o izolacích koagulázanegativních stafylokoků. *S. carnosus* nebyl izolován žádným z citovaných autorů a *S. caprae* pouze z mléčné žlázy koz v 19,7 % (Poutrel, 1984) a 3,6 % (Harvey a Gilmour, 1988). Velmi odlišné jsou údaje o izolacích *S. chromogenes*, kolísající u mléčné žlázy skotu od 0 % (Park a Cho, 1983; Langlois aj., 1984; Rather aj., 1986; Watts aj., 1986; Hogan aj., 1987; Hirata aj., 1987) až po 48,7 % (Boddie aj., 1987). Údaje o četnosti výskytu tohoto druhu u jiných zvířat se rovněž různí. Devriese aj., (1985) popisují u prasat výskyt 16,6 % tohoto druhu, který jsme my izolovali v 6 %, zatímco Shimizu aj. (1987) uvádějí jen 0,3 %. Podobné kolísání platí i pro údaje o výskytu *S. epidermidis*. Zatímco my jsme zachycovali tento druh v rozmezí 2,6—23,7 %, popisují se jeho izolace od 0 % (Devriese aj. 1985; 1984/85; Boddie aj., 1987; Hirata aj., 1987) až do 42,5 % (Jensen aj., 1987), resp. 47,7 % (Poutrel 1984). Většinu autorů se nezdařila izolace *S. haemolyticus* nebo se jejich zjištění téměř shodují s naším pozorováním. Časté izolace tohoto druhu popisují Park a Cho (1983), a to 16,5 % a Devriese a Keyser (1980) 13,2 %. Komplikovaná je situace údajů o výskytu *S. simulans*. Někteří autoři se shodují s naším zjištěním jeho průměrného 2% výskytu (Devriese a Keyser, 1980; Devriese aj., 1984/85; Cox aj., 1984; Boddie aj., 1987), jiní uvádějí značně vysoké hodnoty výskytu tohoto druhu, a to 34,5 % (Hirata aj., 1987), 35 % (Jensen aj., 1987), 41,7 % (Rather aj., 1986) a 43,9 % (Cox aj., 1985). Podobné kolísání zjišťovaného výskytu platí i pro *S. warneri* a zejména *S. hominis*. S naším pozorováním 2,6—8,6 % výskytu *S. hominis* se shodují Cox aj. (1985; 1988), Watts aj. (1986), Hogan aj. (1987), Jensen aj. (1987), Watts a Owens (1987), Harvey a Gilmour (1988) a Harmon a Langlois (1989), zatímco někteří autoři tento druh neizolovali (Park a Cho, 1983; Devriese aj., 1984/85, 1985; Watts aj. 1984; Rather aj., 1986; Boddie aj., 1987), jiní ho izolovali velmi často v 17,7 % (Shimizu aj., 1987) i v 23 % (Langlois aj., 1984).

Jedním z největších rozdílů je náš častý záchyt *S. saprophyticus* zejména z plic skotu (28,8 %) i prasat a z tonzil telat a výsledky jiných autorů, nepřesahující vesměs 5 %. Výjimku činí údaj o 9,2% záchytu (Hirata aj., 1987). Mnohem menší kolísání je v otázce výskytu *S. cohnii*. Diferentní údaje o výskytu *S. xylosus* lze vysvětlit růzností vyšetřovaného materiálu. Tento druh se vyskytuje především na povrchu sliznic nebo kůže. Na kůži hospodářských zvířat byl zjištěn autory Kloos aj. (1976a, 1976b) v 32 % a v sekretu mléčné žlázy skotu v 27 % (Devriese a Keyser, 1980) nebo v 21,1 % (Hirata aj., 1987). Naše zjištění 37% výskytu na povrchu tonzil telat převyšuje údaje i ostatních citovaných autorů. Většina autorů izolovala *S. sciuri* zhruba ve stejném procentu jako my. Nejvyšší hodnoty jeho výskytu, a to 59,7 % u ovcí a 42 % u koz, zjistili Devriese aj. (1985). Těmto autorům se rovněž zdařila izolace *S. lentus* ve vysokých hodnotách, 28,4 % u kura domácího, 26,6 % u prasat a 25,8 % u ovcí, což kontrastuje s negativními záchyty v popisech všech ostatních citovaných autorů i s naším nepatrným záchytem tohoto druhu, který nepřesáhl 0,6 %. Odhlédneme-li od prvního popisu *S. kloosii* (Schleifer aj., 1984), nesetkáme se s uvedením izolace tohoto druhu, který se nám zdařilo zachytit, i když v malých počtech.

Předložené výsledky upozorňují na možnost izolace téměř všech známých stafylokokových druhů z hospodářských zvířat a do jisté míry i na frekvenci jejich výskytu u sledovaných hostitelů. Pokud je lze izolovat z klinicky zdravých jedinců, je možné předpokládat, že se s nimi může setkat bakteriolog vyšetřující materiál z nemocných zvířat, kde jsou dány předpoklady pro jejich značné pomnožení. Doposud nedostatečně vyřešená problematika etiologického významu některých koagulázanegativních druhů, resp. kmenů v rámci druhu, si vyžaduje znalost možnosti výskytu stafylokoků u klinicky zdravého hostitele, k čemuž přispívá předložená studie.

Literatura

- BODDIE, R. L. — NICKERSON, S. C. — OWENS, W. E. — WATTS, J. L.: Udder microflora in nonlactating heifers. *Agri-Practice*, February 1987, s. 22—25.
- COX, H. U. — HOSKINS, J. D. — NEWMAN, S. S. — FOIL, C. S. — TURNWALD, G. H. — ROY, A. F.: Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. *Amer. J. veter. Res.*, 49, 1988, s. 747—751.
- COX, H. U. — HOSKINS, J. D. — NEWMAN, S. S. — TURNWALD, G. H. — FOIL, C. S. — ROY, A. F. — KEARNEY, M. T.: Distribution of staphylococcal species on clinically healthy cats. *Amer. J. veter. Res.*, 46, 1985, s. 1824—1828.
- COX, H. U. — NEWMAN, S. S. — ROY, A. F. — HOSKINS, J. D.: Species of *Staphylococcus* isolated from animal infections. *Cornell Veter.*, 74, 1984, s. 124—135.
- DEVRIESE, L. A.: Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. *Amer. J. veter. Res.*, 38, 1977, s. 787—792.
- DEVRIESE, L. A.: Identification of clumping-factor-negative staphylococci isolated from cows' udders. *Res. veter. Sci.*, 27, 1979, s. 313—320.
- DEVRIESE, L. A.: A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *J. appl. Bact.*, 56, 1984, s. 215—220.
- DEVRIESE, L. A. — KEYSER de, H.: Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. *J. Dairy Res.*, 47, 1980, s. 155—158.
- DEVRIESE, L. A. — NZUAMBE, D. — GODART, C.: Identification and characteristics of staphylococci isolated from lesions and normal skin of horses. *Veter. Microbiol.*, 10, 1984/85, s. 269—277.
- DEVRIESE, L. A. — POUTREL, B. — KILPPER-BÄLZ, R. — SCHLEIFER, K. H.: *Staphylococcus gallinarum* and *Staphylococcus caprae*, two new species from animals. *Int. J. syst. Bact.*, 33, 1983, s. 480—486.

- DEVRIESE, L. A. — SCHLEIFER, K. H. — ADEGOKE, G. O.: Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. *J. appl. Bact.*, 58, 1985, s. 45—55.
- FLEER, A. — VERHOEF, J.: New aspects of staphylococcal infections: emergence of coagulase-negative staphylococci as pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 50, 1984, s. 729—744.
- FRENEY, J. — BRUN, Y. — BES, M. — MEUGNIER, H. — GRIMONT, F. — GRIMONT, P. A. D. — NERVI, C. — FLEURETTE, J.: *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int. J. syst. Bact.*, 38, 1988, s. 168—172.
- GAHRN-HANSEN, B.: Coagulase-negative staphylococci and micrococci in clinical microbiology. *Danish med. Bull.*, 34, 1987, s. 96—114.
- GEMMELL, C. G.: Coagulase-negative staphylococci. *J. med. Microbiol.*, 22, 1986, s. 285—295.
- GEMMELL, C. G.: Pathogenicity of coagulase-negative staphylococci with respect to the nature of the host response. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 266, 1987, s. 52—59.
- HÁJEK, V.: *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. syst. Bact.*, 26, 1976, s. 401—408.
- HÁJEK, V. — DEVRIESE, L. A. — MORDARSKI, M. — GOODFELLOW, M. — PULVERER, G. — VARALDO, P. E.: Elevation of *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* (Devriese et al., 1978) to species status: *Staphylococcus chromogenes* (Devriese et al., 1978) comb. nov. *Syst. appl. Microbiol.*, 8, 1986, s. 169—173.
- HARMON, R. J. — LANGLOIS, B. E.: Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus species*. *Agri-Practice*, 10, 1989, s. 29—34.
- HARVEY, J. — GILMOUR, A.: Isolation and characterization of staphylococci from goat's milk produced in Northern Ireland. *Letters in appl. Microbiol.*, 7, 1988, s. 79—82.
- HIRATA, K. — KATAOKA, Y. — NAKAZAWA, M. — KASHIWAZAKI, M.: *Staphylococcus species* isolated from normal cows milk. *J. Jap. Veter. Med. Ass.*, 40, 1987, s. 498—502.
- HOGAN, J. S. — WHITE, D. G. — PANKEY, J. W.: Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, 70, 1987, s. 873—879.
- JENSEN, M. M. — DOWNS, W. C. — MORREY, J. D. — NICOLL, T. R. — LeFEVRE, S. D. — MEYERS, C. M.: Staphylococcosis of turkeys. 1. Portal of entry and tissue colonization. *Avian. Dis.*, 31, 1987, s. 64—69.
- KILPPER-BÄLZ, R. — SCHLEIFER, K. H.: Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* Faubert and Douglas to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus* (Faubert and Douglas) comb. nov. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Reihe C*, 2, 1981, s. 324—331.
- KLOOS, W. E. — MUSSELWHITE, M. S. — ZIMMERMAN, R. J.: A comparison of the distribution of *Staphylococcus species* on human and animal skin. *Zbl. Bakt. Hyg., Suppl.* 5, 1976a, s. 967—973.
- KLOOS, W. E. — SCHLEIFER, K. H.: Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. *Int. J. syst. Bact.*, 25, 1975, s. 62—79.
- KLOOS, W. E. — SCHLEIFER, K. H.: *Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an inhabitant of the human external ear. *Int. J. syst. Bact.*, 33, 1983, s. 9—14.
- KLOOS, W. E. — SCHLEIFER, K. H.: Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, s. 1013—1035. In: SNEATH, P. H. A. et al. [ed.]: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 1st ed. Vol. II. Baltimore, London, Los Angeles, Sydney. Williams and Wilkins 1986, s. 965—1595.
- KLOOS, W. E. — ZIMMERMAN, R. J. — SMITH, R. F.: Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus species* on animal skin. *Appl. environ. Microbiol.*, 31, 1976b, s. 53—59.
- LANGLOIS, B. E. — HARMON, R. J. — AKERS, K.: Identification of *Staphylococcus species* of bovine origin with the DMS Staph-Trac system. *J. clin. Microbiol.*, 20, 1984, s. 227—230.
- PARK, C. K. — CHO, Y. J.: Studies on staphylococci isolated from bovine udder infections. II. Distribution and biochemical properties of coagulase-negative staphylococci. *Korean J. veter. Res.*, 23, 1983, s. 165—182.
- POUTREL, B.: Udder infections of goats by coagulase-negative staphylococci. *Veter. Microbiol.*, 9, 1984, s. 131—137.
- PULVERER, G. — PETERS, G. — SCHUMACHER-PERDREAU, F.: Coagulase negative staphylococci. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 264, 1987, s. 1—28.
- RATHER, P. N. — DAVIS, A. P. — WILKINSON, B. J.: Slime production by bovine milk *Staphylococcus aureus* and identification of coagulase-negative staphylococcal iso-

- lates. J. clin. Microbiol., 23, 1986, s. 858—862.
- SCHLEIFER, K. H. — FISCHER, U.: Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. Int. J. syst. Bact., 32, 1982, s. 153—156.
- SCHLEIFER, K. H. — GEYER, U. — KILPPER-BÄLZ, R. — DEVRIESE, L. A.: Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus* (Kloos et al.) comb. nov. Syst. appl. Microbiol., 4, 1983, s. 382—387.
- SCHLEIFER, K. H. — KILPPER-BÄLZ, R. — DEVRIESE, L. A.: *Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. nov.: three new coagulase-negative, novobiocin resistant species from animals. Syst. appl. Microbiol., 5, 1984, s. 501—509.
- SCHLEIFER, K. H. — KILPPER-BÄLZ, R. — FISCHER, U. — FALLER, A. — ENDL, J.: Identification of „*Micrococcus candidus*“ ATCC 14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of „*Micrococcus caseolyticus*“ ATCC 13548 and *Micrococcus varians* ATCC 29750 as members of a new species *Staphylococcus caseolyticus*. Int. J. syst. Bact., 32, 1982, s. 15—20.
- SCHLEIFER, K. H. — KLOOS, W. E.: Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. Int. J. syst. Bact., 25, 1975, s. 50—61.
- SHIMIZU, A. — KAWANO, J. — TERANISHI, H. — HAZUE, S. — FUJINAMI, T. — KIMURA, S. — SUGIHARA, K.: Isolation of *Staphylococcus* species from the tonsils of healthy pigs and phage patterns of isolates. Jap. J. veter. Sci., 49, 1987, s. 703—709.
- SKALKA, B.: Izolace kmenů *Staphylococcus hyicus* ze zdravých hostitelů a diagnostická studie kmenů. Veter. Med. (Praha), 33, 1988, s. 607—616.
- WATTS, J. L. — OWENS, W. E.: Synergistic hemolysis associated with coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. J. clin. Microbiol., 25, 1987, s. 2 037—2 039.
- WATTS, J. L. — OWENS, W. E. — NICKERSON, S. C.: Evaluation of the Minitek Gram-positive set for identification of staphylococci isolated from the bovine mammary gland. J. clin. Microbiol., 23, 1986, s. 873—875.
- WATTS, J. L. — PANKEY, J. W. — NICKERSON, S. C.: Evaluation of the Staph-Ident and STAPHase systems for identification of staphylococci from bovine intramammary infections. J. clin. Microbiol., 20, 1984, s. 448—452.

Došlo dne 15. 2. 1990

SKALKA, B. (University of Veterinary Medicine, Brno): *The incidence of staphylococcus species in clinically healthy farm animals*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (1): 9—19.

The incidence of staphylococcus species in healthy animals was investigated in young and adult individuals of cattle, in pigs and in domestic fowl, using the method of selective isolation of strains. A total of 6066 samples was examined; 4567 strains were revealed and they included all known species, except *Staphylococcus caseolyticus*, *S. saccharolyticus*, *S. schleiferi* and *S. lugdunensis*. 3.8 % of strains failed to be identified with any species. The test samples were taken from slaughtered animals, only in calves intravital smears of tonsils were examined. The species most frequently isolated from the tonsil tissue in adult cattle were as follows: *S. aureus* (19.9 %), *S. saprophyticus* (12.4 %), *S. hyicus* (8.8 %) and *S. hominis* (8.6 %). The following species were isolated from the lung tissue: *S. saprophyticus* (28.8 %), *S. cohnii* (10.6 %) and *S. epidermidis* (10.2 %); from the mammary gland parenchyma these were the species *S. saprophyticus* (17.4 %), *S. xylosus* (13.1 %) and *S. epidermidis* (10 %). In the tonsil tissue of pigs the percent proportions of *S. aureus* and *S. hyicus* were 44.5 % and 31.8 %, respectively; the most frequent species detected from the lungs were *S. aureus* (20.6 %), *S. saprophyticus* (12.3 %), *S. hyicus* (12.1 %) and *S. epidermidis* (11.5 %). In domestic fowl the most frequently occurring species were *S. epidermidis* (23.7 %), *S. gallinarum* (16.5 %) and *S. aureus* (15.4 %). In calves the incidence of *S. xylosus* (37 %), *S. saprophyticus* (19.2 %) and *S. cohnii* (15.2 %) was found to be highest. The incidence of the other staphylococcus species in all test animals can be expressed by low percentages.

cattle; pig; domestic fowl; incidence of staphylococcus species; selective isolation of staphylococci

Adresa autora:

Doc. MVDr. Boris Skalka, DrSc., Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

NABÍDKA REPROGRAFICKÝCH SLUŽEB

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna (ÚZLK) ÚVTIZ poskytuje xerokopie článků zveřejněných v bibliografické a referátové službě AGROINDEX i kopie článků z knih a časopisů, které jsou ve fondu ÚZLK.

Cena jedné xerokopie (včetně knihovnické práce) je 2 Kčs.

Požadavky na kopie článků posílejte na formulářích Objednávka reprografické práce, které je možno objednat v Technickém ústředí knihoven ve Slavkově u Brna pod číslem TÚK 138—0.

Objednávky posílejte na adresu:

ÚZLK—ÚVTIZ
OVRMS
Slezská 7
120 56 Praha 2

ENZYMATICKÁ AKTIVITA V PLACENTOMECH KRAV VE VZTAHU K PRŮBĚHU PORODU

J. Čanderle, V. Kummer, Z. Zralý

ČANDERLE, J. — KUMMER, V. — ZRALÝ, Z. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Enzymatická aktivita v placentomech krav ve vztahu k průběhu porodu*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (1): 21–28.

Aktivita aminopeptidáz a katepsinů byla stanovena v homogenátech placentomů krav extirpovaných po porodu telete a dále za čtyři a osm hodin. U krav s retencí sekundin (r.s.) po indukovaném porodu byla aktivita těchto enzymů vždy vyšší než u krav bez r.s., ať po indukovaném nebo spontánním porodu, a byla na obdobné úrovni nebo mírně vyšší než v osmém měsíci březosti. Obsah celkových bílkovin v placentomech krav s r.s. byl rovněž vyšší. Tyto nálezy svědčí o nedostatečném vyžrání, resp. zestárnutí placentární tkáně, které je spojeno s uvolněním lysozomálních enzymů. Enzymy se mimo jiné uplatňují na separaci fetální placenty od mateřské hydrolýzou a modifikací bílkovin intercelulárních vazeb.

skot; indukce porodu; retence sekundin; aminopeptidázy; katepsiny; celkové bílkoviny

Součástí fyziologické přípravy na porod jsou funkční a morfologické změny placenty. Morfologické změny placentárních struktur u krávy v peripartálním období popsali např. Grunert aj., 1976; Kummer aj., 1987 a Williams aj., 1987. Funkční změny v transportních, metabolických, endokrinních a imunitních systémech jsou u tohoto druhu poznány jen v jednotlivostech (Baird a McDonald, 1964; Aust aj., 1977; Ferrell a Ford, 1980; Williams a Gross, 1981 a další).

Odrazem změn funkční aktivity tkáně jsou změny v aktivitě enzymů, rozdílná distribuce enzymů, substrátů a metabolických produktů v jednotlivých částech buňky, resp. tkáně. Prostřednictvím enzymů uplatňují svůj regulační vliv i hormony. Enzymy proteázového typu modulují účinky hormonů tím, že mění vlastnosti buněčných receptorů a u hormonů peptidových nebo proteinových jsou součástí jejich degradačního systému. Důkazy o tom, že aminopeptidázy degradují receptory LH—RH v hypothalamu a hypofýze krys podali Kuhl aj. (1976). Jako indikátor buněčné aktivity placenty u lidí je použili Nesit a Pětroš (1981). Šimko (1982) hodnotil funkci lidské placenty podle aktivity katepsinů. Artal aj. (1979) prokázali, že katepsiny se podílí na degradaci konců molekul kolagenu a dekompozice vláken kolagenu pak umožňuje rupturu plodových obalů. Cílem práce bylo sledovat aktivitu vybraných enzymů v placentě krav v době porodu, zvláště ve vztahu k časnému poporodnímu stadiu.

MATERIÁL A METODY

Aktivita aminopeptidáz [arylamidáz] a katepsinů byla stanovena v homogenátech placentomů 34 krav plemen české strakaté, černé nížinné a jejich kříženek. Průměrný věk krav byl 5,3 roku a hmotnost 593 kg. U devíti z nich byl nástup porodu indukován i. m. aplikací 750 μ g cloprostenolu (Oestrophan Spofa) a u sedmi 20 mg dexamethasonu v průměru 277. den gravidity (274. — 284. den). U deseti nebyl nástup porodu medikamentózně ovlivněn a porodily v průměru 282,5 dne po inseminaci. Placentomy byly odebrány extirpací *per vaginam* z kaudální části dělohy, vždy bezprostředně po vypuzení telete a následně za čtyři a osm hodin (*p.p.*), jestliže bylo zachováno spojení fetální a mateřské placenty. Dále byly odebrány placentomy od osmi krav při hysterektomii v osmém měsíci gravidity (*a.p.*).

Homogenáty byly připraveny neprodleně po odběru tak, že ze střední části placentomu byly zhotoveny řezy 3 — 5 mm tlusté (asi 10 g tkáně), které byly zmrazeny v tekutém dusíku a v tříštivém mlýnku rozdrceny. Tkáňový prášek v navážce 500 mg byl homogenizován 90 s ve 2 ml na teplotu 2 °C vychlazeného 66,7 nmol.l⁻¹ fosfátového pufru (pH 7,4) skleněným pístovým homogenizátorem. Homogenáty zbavené buněčné drtí a jader odstředěním 800 g po dobu 15 min při teplotě 0 °C byly uchovány do dalšího zpracování při teplotě -20 °C.

Ke stanovení aktivity aminopeptidáz byla použita kinetická metoda, jejímž principem je hydrolyza chromogenního substrátu, při níž se uvolňuje žlutý p-nitroanilin (NAP), který je měřen fotometricky přímo v průběhu počáteční reakce. Základní inkubační směs obsahovala 1,8 ml 66,7 nmol.l⁻¹ fosfátového pufru (s přídavkem 0,5 g hovězího albuminu na 100 ml) a 0,1 ml homogenátu. Směs byla inkubována 10 min při teplotě 25 °C a enzymatická reakce byla odstartována přidáním 0,1 ml 10⁻² mol.l⁻¹ základního roztoku substrátu v dimetylsulfoxidu. Jako substráty byly použity chromogenní aminokyselinové substituenty s p-nitroanilinem (NAP), a to L-leucin-NAP, L-lyzin-NAP, 2 HBr, glycyl-NAP, L-fenylalanin-NAP a S-benzyl-L-cystein-NAP. Po té byla reakční směs přelita do fotometrických kyvet trvale temperovaných na teplotu 25 °C s šíří měřené vrstvy 10 mm. Absorpce světla směsi byla měřena proti vzduchu při vlnové délce světla 405 nm vždy odečtena pětikrát v minutových intervalech. Aktivita aminopeptidáz je udávána v jednotkách [mU], odpovídajících množství nanomolů substrátu přeměněného enzymem za minutu v litru biologického materiálu za standardních podmínek objemu a teploty (nmol.min⁻¹.l⁻¹ (25 °C)).

Katepsinová aktivita (KA), která zahrnuje komplex enzymů s proteolytickým účinkem ve slabě kyselém prostředí, byla stanovena metodou podle Homolky (1969). K 1 ml citranfosforečnanového pufru (66,7 nmol.l⁻¹, pH 3,8) bylo přidáno 250 μ l homogenátu a po promísení rozpipetováno po 500 μ l do dvou zkumavek. V jedné z nich (kontrolní) byla sražena bílkovina kyselinou trichloroctovou ihned a v druhé (test) za 24 hodin po inkubaci při teplotě 37 °C. V supernatantu po neutralizaci a po přidání fenolového Folin-Ciocalteuova činidla bylo fotometricky stanoveno modré zabarvení proti vodě, při vlnové délce světla 645 nm a byl vypočítán rozdíl absorbance testu vůči kontrolnímu stanovení.

Ve všech případech byla stanovení provedena v duplikátech a ve snaze objektivizovat výsledky měření byla zjištěná aktivita přepočtena na hmotnostní jednotku bílkovin obsažených v daném objemu homogenátu. Ke stanovení celkové bílkoviny v homogenátu byla použita metoda Lowryho a kol. (Homolka, 1969). Jako standard sloužil roztok hovězího albuminu, ve kterém byl obsah bílkovin určen stanovením dusíku Kjeldahlovou metodou. Absorpce světla ve vzorcích standardu a testu byla měřena při vlnové délce světla 506 nm proti slepé zkoušce.

Výsledky stanovení jsou uváděny v aritmetických průměrech se střední chybou aritmetického průměru. K hodnocení statistické významnosti rozdílu průměru stanovení bylo použito Studentova *t*-testu.

VÝSLEDKY

U 16 krav došlo k porodu telete do 53 hodin po ošetření cloprostogenem nebo dexametasonem (v průměru za 37,2 $\pm$ 2,4 hodiny). Gravidita byla indukcí porodu zkrácena v průměru o čtyři dny ve srovnání s trváním gravidity 282,5 $\pm$ 1,5 dne u kontrolní skupiny krav. Déle jak 12 hodin po porodu byly zadrženy plodové obaly (*r.s.*) u 11 krav (68,7 %) ze

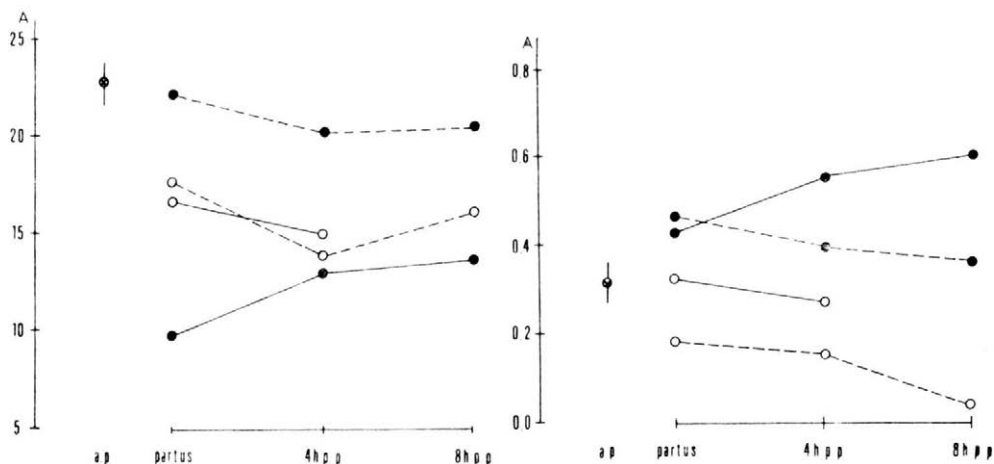
skupiny s indukcí porodu a u dvou (20 %) ze skupiny kontrolní se spontánním porodem.

V závislosti na čase po porodu byl pozorován mírný trend ke snižování aktivity aminopeptidáz v placentomech odebraných za čtyři a osm hodin po porodu telete, pouze u krav s r. s. po spontánním porodu docházelo k mírnému zvýšení aktivity (obr. 1 a 2).

Aktivitu aminopeptidáz v homogenátech placentomů krav, rozdělených podle způsobu zahájení porodu a průběhu jeho porodního stadia (vypuzení či zadržení plodových obalů), avšak bez rozlišení doby odběru, vůči jednotlivým substrátům shrnuje tab. I. Aktivita enzymů štěpících L-leucin—NAP, který byl z použitých substrátů nejrychleji hydrolyzován, byla nejvyšší v placentomech krav s r.s. po indukovaném porodu ($21,011 \pm 0,740$ mU.mg⁻¹ celkových bílkovin; $P < 0,001$), kdežto u dvou krav s r.s. po spontánním porodu byla aktivita nejnižší ($P < 0,01$). V placentomech odebraných v osmém měsíci březosti byla zjištěna rovněž vysoká aktivita ($22,756 \pm 1,292$ mU.mg⁻¹ celkových bílkovin).

Hydrolýza L-lyzinu—NAP enzymy placentomů krav s r.s. byla významně vyšší jak po indukovaném porodu ($P < 0,001$), tak po spontánním porodu ($P < 0,05$) než u krav bez r.s. i u krav v osmém měsíci březosti ($1,869 \pm 0,290$ mU.mg⁻¹ celkových bílkovin), která však byla významně vyšší než u krav bez r.s. ($P < 0,05$).

Za daných podmínek proti nejpomaleji hydrolyzovanému substrátu glycinu—NAP byla aktivita aminopeptidáz vyšší rovněž v placentomech krav s r.s. obou skupin, z nichž u krav po indukovaném porodu vysoce významně ($P < 0,001$) než u krav bez r.s. téže porodní skupiny. Aktivita



— spontánní porod, — — — indukovaný porod, ○ bez retence sekundin, ● s retencí sekundin, ⊙ hysterektomie v osmém měsíci březosti; vysvětlivky platí pro obr. 1—4 — spontaneous parturition, — — — induced parturition, ○ without afterbirth retention, ● with afterbirth retention, ⊙ hysterectomy in the eighth month of pregnancy; the explanations apply to Figs. 1—4

1. Aktivita L-leucin-NAP aminopeptidázy v placentomech krav; A = mU.mg⁻¹ celkových bílkovin — The activity of L-leucine-NAP aminopeptidase in placentomas of cows; A = mU.mg⁻¹ total protein

2. Aktivita glycin-NAP aminopeptidázy v placentomech krav; A = mU.mg⁻¹ celkových bílkovin — The activity of glycine-NAP aminopeptidase in placentomas of cows; A = mU.mg⁻¹ total protein

I. Aktivita aminopeptidáz v homogenátech placentomů krav (mU.mg⁻¹ celkových bílkovin) — Amino-peptidase activity in placenta homogenates in cows (mU.mg⁻¹ of total proteins)

Substrát ¹	Spontánní porod ²		Indukovaný porod ³	
	bez retence sekundin ⁴	s retencí sekundin ⁵	bez retence sekundin ⁴	s retencí sekundin ⁵
	n = 13	n = 6	n = 12	n = 33
L-leucin—NAP	15,774 ± 0,957	12,203 ± 0,719	15,836 ± 0,811	21,011 ± 0,740
L-lyzin—NAP	1,429 ± 0,112	2,195 ± 0,416	1,102 ± 0,145	2,232 ± 0,095
glycin—NAP	0,298 ± 0,030	0,529 ± 0,141	0,150 ± 0,036	0,409 ± 0,027
L-fenyl—alanin—NAP	3,372 ± 0,228	2,923 ± 0,262	2,287 ± 0,116	3,769 ± 0,161
Cys(Bzl)—NAP	2,972 ± 0,216	2,857 ± 0,195	2,313 ± 0,201	3,399 ± 0,174

¹substrate, ²spontaneous parturition, ³induced parturition, ⁴without afterbirth retention, ⁵with afterbirth retention

$x \pm s_x$ = aritmetický průměr ± střední chyba aritmetického průměru — $x \pm s_x$ = arithmetical mean ± mean error of arithmetical mean

n = počet vyšetřených placentomů — n = number examined placentomas

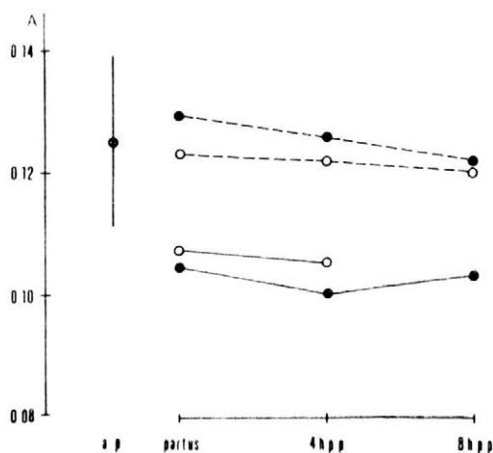
placentárních aminopeptidáz krav osm měsíců březích byla v tomto případě $0,311 \pm 0,042$ mU.mg⁻¹ celkových bílkovin.

Aktivita vůči L-fenylalaninu—NAP byla rovněž nejvyšší u krav s retencí sekundin po indukovaném porodu a byla na obdobné úrovni jako u krav v osmém měsíci gravidity ($3,863 \pm 0,331$ mU.mg⁻¹ celkových bílkovin), což je ve srovnání se zbývajícím skupinami krav významně vyšší aktivita ($P < 0,01$).

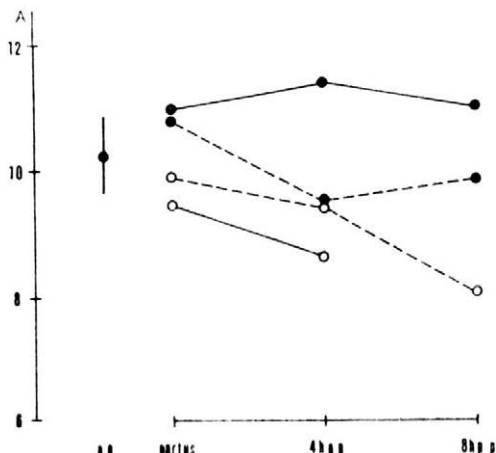
S-benzyl—L—cystein—NAP, substrát používaný v humánním porodnictví ke sledování aktivity cysteinaminopeptidázy (oxytocinázy) v séru těhotných žen, byl obdobně jako většina předchozích substrátů hydrolyzován rychleji homogenáty placentomů krav s r.s. po indukovaném porodu, a to vysoce významně ve srovnání s aktivitou u krav bez r.s. po indukaci porodu ($P < 0,001$) i u krav v osmém měsíci březosti ($P < 0,01$).

Průměrná aktivita kyselých katepsinů v homogenátech (obr. 3) byla vyšší u krav s indukovanými porody než se spontánními, a to statisticky vysoce významně ($P < 0,001$). V placentomech krav s indukovanými porody, které byly následovány r.s. ve srovnání s placentomy krav téže skupiny, ale bez retence, byla katepsinová aktivita (KA) nevýznamně vyšší a u dvou krav s retencí sekundin po spontánním porodu byly naopak nevýznamně nižší než u krav s fyziologickým odchodem fetální placenty po spontánním porodu. Celkově placentomy krav s retencí sekundin vykazovaly vyšší KA než placentomy krav se spontánním odchodem lůžka ($P < 0,025$). V placentomech odebraných v osmém měsíci gravidity byla zjištěna KA na úrovni placentomů s retencí po indukovaných porodech.

Celkové bílkoviny (obr. 4) byly stanoveny s cílem objektivizace stanovení aktivity enzymů. Zároveň však ukazují na biologickou kvalitu



3. Aktivita katepsinů v placentomech krav; $A = \Delta A \cdot \text{mg}^{-1}$ celkových bílkovin — The activity of cathepsins in placentomas of cows; $A = \Delta A \cdot \text{mg}^{-1}$ total protein



4. Obsah celkových bílkovin v placentomech krav; $A = \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ homogenátu — The content of total proteins in placentomas of cows $A = \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ homogenate

tkáň. Byl zjištěn vysoce významný rozdíl mezi průměrným obsahem celkových bílkovin v homogenátech placentomů krav s r.s. $10,190 \pm 0,216 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a bez retence $9,170 \pm 0,314 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($P < 0,005$), přičemž rozdíl mezi obsahem proteinů v placentomech krav s indukovanými nebo spontánními porody, $9,851 \pm 0,198 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $9,651 \pm 0,441$, nebyl významný ($P > 0,05$). Nnejnižší obsah byl zjištěn u krav spontánně porodivších bez následné retence sekundin ($8,979 \pm 0,536 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Celkové bílkoviny v placentomech odebraných po laparotomii v osmém měsíci gravidity byly na obdobné úrovni jako u krav s r. s. a jejich obsah činil $10,220 \pm 0,582 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

DISKUSE

Z poznatků dosud nashromážděných vyplývá, že na ukončení gravidity porodem se podílí komplex dějů, které jsou závislé na funkční vyzrálosti regulačních systémů matky a plodu a na jejich interakcích. Příprava na porod a jeho průběh jsou doprovázeny dramatickými změnami v syntéze, uvolňování a metabolismu řady hormonů, především estrogenů, progesteronu, kortikosteroidů, prostaglandinu $F_{2\alpha}$ aj. (K u d l á č aj., 1987). Mimo endokrinních systémů se zde uplatňují i nervové a imunitní systémy matky a plodu.

Navození porodu indukci vychází z možnosti vyvolat luteolýzu aplikací prostaglandinu $F_{2\alpha}$ nebo jeho analog a rovněž kortikosteroidů. Indukované porody jsou však u krav doprovázeny ve zvýšené míře retencí sekundin, což potvrdily i naše výsledky (68,8 %). To svědčí o disproporcii mezi navozenými podmínkami umožňujícími porodní činnost (uvolnění porodních cest a kontrakce myometria) a podmínkami umožňujícími uvolnění plodové části placenty od mateřské.

Přetrvávající funkční aktivitu u zadržených placent dokládají námi zjištěné vyšší aktivity aminopeptidáz, zvláště u krav s indukci porodu. Úroveň aktivity sledovaných enzymů byla v těchto případech obdobná jako u placent odebraných od krav v osmém měsíci březosti. Naopak aktivita aminopeptidáz v placentách krav, u nichž došlo k odloučení a vypuzení plodových obalů do 8 až 12 hodin po porodu, byla nižší než u krav před porodem. U placent zadržených po spontánním porodu se vždy tento trend neprojevil nebo byl méně výrazný, což lze vysvětlit jednak menším počtem vyšetření (pouze u dvou krav) a jednak možnou odlišnou etiologií retence. Aktivita katepsinů byla vyšší v placentomech krav s indukcí porodu než u krav se spontánním nástupem porodu a byla na úrovni předporodních aktivit. Nejvyšší aktivita byla opět zjištěna u krav s retencí sekundin po indukovaném porodu.

Způsob zpracování a homogenizace placentomů umožňují usuzovat, že byl získán celkový obsah (pool) enzymů v tkáni. Blahovec aj. (1973) zpracovávali nativní placentu nožovým homogenizátorem při teplotě okolo 0 °C a zjistili pro většinu substrátů vyšší aktivitu v supernatantu po ultracentrifugaci než v celém homogenátu, což nasvědčuje, že enzymy nebyly vázány na nerozpustné části buňky. Zmrazení a rozmrazení při homogenizaci v našem případě umožnilo navíc dokonalé uvolnění enzymů z buněčných organel. Nejvyšší aktivitu zjistili výše uvedení autoři v placentě ve srovnání s dalšími orgány krav v době porodu a ve shodě s námi z použitých substrátů vůči L-leucinu-NAP.

Námi zjištěné rozdílné aktivity aminopeptidáz a katepsinů v placentě ve vztahu ke způsobu vedení a průběhu porodu nemáme možnost srovnávat s obdobnými poznatky u skotu. Nesit a Pětroš (1981) zjistili v krvi žen s intrauterinní hypotrofií plodu nebo při jeho přenášení nižší aktivitu placentární cysteinaminopeptidázy. Tato aktivita byla v určitém pozitivním vztahu k hmotnosti plodu a placenty. Obdobné monitorování funkční úrovně placenty v periferní krvi matky není možné u krav vzhledem k rozdílnému typu placenty (Šlesinger, 1967; Hrabák aj., 1976a). Naopak u březích morčat se stejným typem placenty jako u žen zjistili Hrabák aj. (1976b), že k termínu porodu dochází v krvi k poklesu aktivity uvedeného enzymu a rovněž před abortem po pokusné infekci. Sníženou aktivitu aminopeptidáz a katepsinů v placentách krav se spontánním porodem a s včasným odchodem lůžka lze vysvětlit jak jejich sníženou tvorbou, tak vyčerpáním. O nižší proteosyntéze v těchto placentách napovídá i nižší celkový obsah bílkovin. Významné rozdíly v aktivitě enzymů při přepočtu na hmotnostní jednotku celkových bílkovin svědčí však i pro inaktivaci enzymů již vytvořených jejich uvolněním a vazbou na substrát. Snížená tvorba enzymů, jejich inaktivace a modifikace i nižší proteosyntéza jsou obecně zjišťovány při zestárnutí tkání a organismů (Hocman, 1981). V případě placenty lze uvažovat i o zvýšené specifické proteolýze ke konci březosti a k porodu (Gross aj., 1985). Šimko (1982) potvrdil, že stárnutí placenty u lidí a její poškození způsobují pokles aktivity katepsinů a změnu jejich distribuce v tkáni.

Williams aj. (1987) spojují významný úbytek binukleárních buněk v placentární tkáni krav při fyziologickém průběhu porodu s uvolněním enzymů hydrolyzujících nebo modifikujících bílkoviny celulárního spojení (glykoproteiny, kolageny apod.), což umožňuje vzájemnou separaci mateřské a fetální části placenty. Těmto představám odpovídají i naše ná-

lezy a absence těchto procesů může být příčinou retence sekundin, zvláště po indukovaném porodu.

Literatura

- ARTAL, R. — BURGESSON, R. E. — HOBEL, C. J. — HOLLISTER, D.: An *in vitro* model for the study of enzymatically mediated biomechanical changes in the chorioamniotic membranes. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 133, 1979, s. 656—659.
- AUST, A. E. — FAIRCLOUGH, R. J. — KALTENBACH, C. — WELCH, R. A. S.: Induction of aromatase activity in bovine placental microsomes before normal and induced parturition. *Fed. Proc.*, 36, 1977, s. 914.
- BAIRD, E. R. — McDONALD, L. E.: *In vitro* oxygen uptake by the maturing bovine placenta. *Amer. J. veter. Res.*, 25, 1964, s. 367—370.
- BLAHOVEC, J. — BARTÍK, M. — ŠLESÁROVÁ, L.: Activity of arylamidases in some bovine organs and their chromatographic separation on Sephadex G-200. *Coll. Czechoslov. Chem. Comm.*, 38, 1973, s. 159—165.
- FERRELL, C. L. — FORD, S. P.: Blood flow steroid secretion and nutrient uptake of the gravid bovine uterus. *J. anim. Sci.*, 50, 1980, s. 1113—1121.
- GROSS, T. S. — WILLIAMS, W. F. — MANSPEAKER, J. E. — RUSSEK, E.: *In vitro* proteolytic activity of the late pregnant and peripartum bovine placenta. *J. anim. Sci.*, 61, 1985, suppl. 1, s. 391—392.
- GRUNERT, E. — SCHULZ, L. C. — AHLERS, D.: Retained placenta problems with induced labour in cattle. *Ann. Rech. vétér.*, 7, 1976, s. 135—138.
- HOCMAN, G.: Nové názory na stárnutí. *Novinky v medicíně*, (21), Praha, Avicenum 1981, s. 68—103.
- HOMOLKA, J.: Klinické biochemické vyšetřovací metody s použitím mikro- a ultramicroanalýsy. 1. vyd. Praha, SZN 1969, 440 s.
- HRABÁK, R. — BAETZ, A. L. — CYSEWSKI, S. J.: Cystine aminopeptidase (oxytocinase) activity in plasma and tissue of normal and infected pregnant cattle. *Amer. J. veter. Res.*, 37, 1976a, s. 835—836.
- HRABÁK, R. — BAETZ, A. L. — BRYNER, J. H.: Cystine aminopeptidase (oxytocinase) in pregnant quinea pigs: normal and infected with *Campylobacter fetus*. *Amer. J. veter. Res.*, 37, 1976b, s. 343—344.
- KUDLÁČ, E. — ELEČKO, J. aj.: Veterinární porodnictví a gynekologie. 2. vyd. Praha, SZN 1987, 567 s.
- KUHL, H. — ROSNIATOWSKI, CH. — TAUBERT, H. D.: The activity of an LH—RH degrading enzyme in the anterior pituitary, during the rat oestrus cycle and alteration by injections of sex hormones. *Acta endocrin* 87, 1978, s. 476—484.
- KUMMER, V. — ZRALÝ, Z. — ČANDERLE, J. — ŠVECOVÁ, D.: Histologické a histochemické vyšetření placentomů krav při indukovaných porodech. *Veter. Med. (Praha)*, 32, 1987, s. 9—17.
- NESIT, V. — PĚTROŠ, J.: Cystin-aminopeptidáza, celková a placentární leucin-aminopeptidáza u patologií v graviditě. *Českoslov. Gynekol.*, 46, 1981, s. 506—520.
- ŠIMKO, J.: Diagnostická a prognostická hodnota vyšetření katepsinové aktivity v krvi a plodové vodě při rizikové graviditě. *Českoslov. Gynekol.*, 47, 1982, s. 120—125.
- ŠLESINGER, L.: Aktivita leucinaminopeptidázy u březích krav a fen. *Veter. Med. (Praha)*, 12, 1967, s. 269—272.
- WILLIAMS, W. F. — GROSS, T. S.: Bovine placental prostaglandin synthesis at partum. *J. anim. Sci.*, 53, 1981, suppl. 1, s. 376.
- WILLIAMS, W. F. — MARGOLIS, M. J. — MANSPEAKER, J. DOUGLASS, L.W. — DAVIDSON, J. P.: Peripartum changes in the bovine placenta related to fetal membrane retention. *Theriogenology*, 28, 1987, s. 213—224.

Došlo dne 6. 2. 1990

ČANDERLE, J. — KUMMER, V. — ZRALÝ, Z. (Veterinary Research Institute, Brno): *Enzymatic activity in placentomas of cows in relation to the course of parturition*. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991 (1): 21—28.

The activity of aminopeptidases and cathepsins was determined in placentoma homogenates; placentomas of cows were extirpated immediately after parturition and in four and eight hours. In cows with afterbirth retention (a. r.) following induced parturition, the activity of these enzymes was always higher than in cows without a. r., no matter if after induced and spontaneous parturitions; it was at a similar or slightly

higher level than in the eighth month of pregnancy. The content of total proteins in placentomas of cows with a. r. was also higher. These findings point to the insufficient ripening, or aging of placental tissue, which is related to a release of lysosomal enzymes. The enzymes are active through hydrolysis in the separation of foetal placenta from the maternal one and in the modification of proteins participating in intercellular linkages.

cattle; parturition induction; afterbirth retention; aminopeptidases; cathepsins; total proteins

Adresy autorů:

MVDr. Jiří Čanderle, CSc., MVDr. Vladimír Kummer, CSc., MVDr. Zdeněk Zralý, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

VPLYV MONENZĚINU NA FERMENTÁCIU DIÉT S RÔZNYM PODIELOM SENA A KONCENTRÁTU V UMELOM BACHORE (RUSITEC)

D. Jalč, M. Baran, T. Vondrák, P. Široka

JALČ, D. — BARAN, M. — VONDŘÁK, T. — ŠIROKA, P. (Ústav fyziologie hospodárskych zvierat SAV, Košice): *Vplyv monenzínu na fermentáciu diét s rôznym podielom sena a koncentrátu v umelom bachore (RUSITEC)*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (1): 29—38.

Pokus bol uskutočnený v umelom bachore (RUSITEC — Rumen Simulation Technique). V štyroch fermentačných nádobách (V) bol podiel sena a jačmeňa následovný [%] : V₁ — 40:60, V₂ — 60:40, V₃ — 80:20 a V₄ — 100:0. Denne do každej fermentačnej nádoby bolo dodané 5 mg monenzínu rozpusteného v 1 ml 96% etanolu. Všetky diéty boli izonitrogénne a po dodaní močoviny obsah hrubého proteínu (CP) v každej diéte bol 13 %. Experiment trval 12 dní, pričom prvých šesť dní trvala tzv. steady state perióda, počas ktorej sa stabilizovali podmienky fermentácie. Monenzín znížil stráviteľnosť sušiny, produkciu celkových unikavých mastných kyselín (UMK), kyseliny octovej, n—maslovej, izovalérovej a pomer acetátu a propionátu a zvýšil produkciu kyseliny propiónovej a n—valérovej. Znížila sa produkcia metánu a CO₂. Vyšší podiel sena v diétach mal za následok zníženie stráviteľnosti sušiny, detergentnej vlákniny, celkových i jednotlivých UMK, CO₂, metánu, energetickej výťažnosti UMK (E), ďalej zníženie využitia glukózy, produkcie adenosintrifosfátu (ATP) a produkcie fermentovaných hexóz. Znížila sa aj produkcia, utilizácia a návratnosť metabolického vodíka. Účinnosť syntézy mikrobiálnej hmoty (Y_{ATP} = 11,3) bola najvyššia pri fermentácii diéty s obsahom 60 % sena a 40 % jačmeňa.

monenzín; umelý bachor (RUSITEC); unikavé mastné kyseliny (UMK); CO₂; metán; konečné produkty fermentácie

Pre dosiahnutie lepšej efektívnosti výkrmu prežúvavcov sa v poslednom desaťročí používajú vo svete rôzne mikrobiálne, chemické a enzymatické preparáty. V najväčšej miere sa z nich používa monenzín — biologicky aktívna látka produkovaná plesňou *Streptomyces cinna monensis*. Experimenty *in vitro* ukázali, že monenzín ovplyvňuje mikrobiálnu populáciu v bachore prežúvavcov zmenou proporcie vytváraných unikavých mastných kyselín (UMK). Vplyvom monenzínu dochádza k zvýšenej produkcii kyseliny propiónovej, zníženej produkcii kyseliny octovej a n—maslovej a k čiastočnej inhibícii metanogenézy (Thornton a i., 1976; Jouany a Senaud, 1978; Chalupa a i., 1980).

Monenzín tiež znižuje koncentráciu amoniaku v bachore a prietok bakteriálneho dusíka do duodena (Hanson a Klopfenstein, 1973; Poosa i., 1979).

Vplyv monenzínu na bachorovú fermentáciu bol sledovaný *in vitro* (Van Nevel a Demeyer, 1977) a tiež v umelom bachore (RUSITEC) (Wallace a i., 1980, 1981; Stanier a Davis, 1981). RUSITEC je fermentačné zariadenie, používané k štúdiu bachorovej fermentácie za prísne kontrolovateľných podmienok (Czerkawski a Breckenridge, 1977) a oproti iným *in vitro* systémom (Van Nevel a Demeyer, 1977) má výhodu v tom, že stabilná fermentácia môže byť v Rusitecu udržiavaná po dobu niekoľko týždňov.

Cieľom tejto práce bolo sledovať vplyv monenzínu na základné parametre fermentácie a konečné produkty fermentácie v umelom bachore pri fermentácii celoobjemnej, vysokoobjemnej a koncentrovanej diéty.

MATERIÁL A METÓDY

Fermentácia krmív bola uskutočnená v umelom bachore (RUSITEC), ako ho popisuje Czerkawski a Breckenridge (1977). Objem fermentačných nádob bol 850 ml a prietok umelých slín (Mc Dougal, 1948) 750–850 ml.deň⁻¹. Ako inokulum sme použili bachorový obsah dospelých baranov plemena merino, kŕmených lúčnym senom (1200 g.deň⁻¹). Tekutý bachorový obsah bol odobratý cez bachorovú fistulu vývevou a pevný bachorový obsah kliešťami. Koncentrácia unikavých mastných kyselín (UMK) v effluente bola stanovená metódou plynovej chromatografie (Cottyn a Boucque, 1968) za použitia kyseliny krotónovej ako interného štandardu na plynovom chromatografe Perkin Elmer 8500. Objem produkovaných plynov bol meraný prietokovým plynomerom a plyny (metán a oxid uhličitý) boli analyzované plynovou chromatografiou (Czerkawski a Clapperton, 1968) na plynovom chromatografe Chrom 4. Amoniakálny dusík v effluente sme stanovili mikrodifúznou metódou (Conway a O'Malley, 1948).

Nestrávené zbytky krmiva po premytí s Mc Dougalovým pufrom boli sušené do konštantnej hmotnosti pri teplote 105 °C k stanoveniu stráviteľnosti sušiny (DH) a detergentnej vlákniny (Goering a Van Soest, 1970). Mikrobiálna sušina effluentu bola získaná dvojnásobným centrifugovaním effluentu pri 20 000 g po dobu 30 minút, dvojnásobnom premytí vodou a vysušením zbytku do konštantnej hmotnosti pri teplote 105 °C. V nestrávených zbytkoch krmiva a effluente sme stanovili kyselinu diaminopimelovú (DAP) (Czerkawski, 1974). Konečné produkty fermentácie boli vypočítané zo stoichiometrických vzťahov ako ich uvádza Czerkawski (1986). Experiment bol uskutočnený v štyroch fermentačných nádobách (V₁), 80 g pevnej tráveniny bachora bolo navážené do nylonových vrecúšok o veľkosti ok 200 µm, dané do každej fermentačnej nádoby, ktoré boli naplnené zmesou bachorovej tekutiny a Mc Dougalovho pufru (1:1). V denných intervaloch, zahrňujúc prvý deň experimentu, všetky nádoby boli tiež doplnené krmivom — senom a mletým jačmeňom v nasledujúcich množstvách: V₁ — 5,43 g a 7,87 g DM (40:60 %). V₂ — 8,15 a 5,25 g DM (60:40 %). V₃ — 10,86 a 2,62 g DM (80:20 %) a V₄ — 13,58 g DM (100:0 %) a uzavreté v nylonových vrecúškach. Každé vrecúško zotrvalo v nádobe dva dni.

Monenzín (Elanco Products CO., Indianapolis) sme rozpustili v 96% etanole. Počnúc od druhého dňa experimentu sme denne dodali 1 ml 96% etanolu s obsahom 5 mg monenzínu do fermentačného média fermentačných nádob V₁, V₂, V₃ a V₄. Do Mc Dougalovho pufru infundovaného cez peristaltickú pumpu sme dodali do V₁ — 108,2, V₂ — 157,4, V₃ — 205,9 a V₄ — 250,0 mg močoviny. Týmto sme dosiahli, že každá diéta po doplnení močovinou obsahovala 13 % hrubého proteínu (CP).

Experiment trval 12 dní. Počas prvých šiest dní (steady state perióda) sa stabilizovali podmienky fermentácie. Na 7. až 12. deň sa odberali vzorky effluentu, plynu a zbytkového krmiva na analýzy ako to uvádza Czerkawski a Breckenridge (1977).

VÝSLEDKY

Fermentácia kŕmnej diéty počas celej doby experimentu bola uskutočnená pri pH 6,69 až 6,92 fermentačného média. Stráviteľnosť sušiny (DM) sa postupne znižovala so stúpajúcim podielom objemového krmiva v kŕmnej dávke (tab. I). Tiež sa znižovala stráviteľnosť neutrálnej detergentnej

I. Vplyv monenzínu na stráviteľnosť diét a produkciu celkových unikavých mastných kyselín (UMK) — The effect of monensin on feed digestibility and production of total volatile fatty acids (UMK)

Ukazovateľ ¹	Diéta 1	Diéta 2	Diéta 3	Diéta 4
Stráviteľnosť diéty ² [%]	60,14 ±1,16	53,72 ±0,66***	43,70 ±0,64***	36,54 ±1,16***
NH ₃ -N v effluente ³ [mmol.l ⁻¹]	5,33 ±0,15	6,91 ±0,16	7,20 ±0,19***	7,63 ±0,15***
Produkcia celkových UMK ⁴ [mmol.deň ⁻¹]	54,32 ±1,93	50,51 ±1,44	39,57 ±1,27***	35,13 ±3,48***
Produkcia kyseliny octovej ⁵ [mmol.deň ⁻¹]	20,17 ±0,47	19,78 ±0,56	16,73 ±0,49***	16,59 ±1,63*
Produkcia kyseliny propiónovej ⁶ [mmol.deň ⁻¹]	28,58 ±1,60	25,69 ±0,84	18,68 ±0,53	15,20 ±1,55***
Produkcia kyseliny n-maslovej ⁷ [mmol.deň ⁻¹]	1,80 ±0,12	1,70 ±0,11	1,37 ±0,11***	1,83 ±0,13
Produkcia kyseliny n-valérovej ⁸ [mmol.deň ⁻¹]	4,59 ±0,30	2,84 ±0,21***	1,85 ±0,22***	1,34 ±0,29***
Produkcia kyseliny izo-valérovej ⁹ [mmol.deň ⁻¹]	0,47 ±0,04	0,48 ±0,06	0,33 ±0,05***	0,32 ±0,08**
Pomer acetátu a propionátu ¹⁰	0,75 ±0,09	0,77 ±0,03	0,87 ±0,04*	1,09 ±0,02***

¹characteristic, ²feed digestibility, ³NH₃-N in effluent, ⁴production of total VFA, ⁵production of acetic acid, ⁶production of propionic acid, ⁷production of n-butyric acid, ⁸production of n-valeric acid, ⁹production of isovaleric acid, ¹⁰acetate:propionate proportion

Vysvetlivky pro tab. I—IV — Explanatory notes to Tabs. I—IV:

* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$; ± = štandardná stredná chyba (SEM) — standard mean error (SEM)

Diéta 1 = podiel sena a jačmeňa 40:60 ‰ — Diet 1 = hay and barley percent proportion of 40:60

Diéta 2 = podiel sena a jačmeňa 60:40 ‰ — Diet 2 = hay and barley percent proportion of 60:40

Diéta 3 = podiel sena a jačmeňa 80:20 ‰ — Diet 3 = hay and barley percent proportion of 80:20

Diéta 4 = podiel sena a jačmeňa 100:0 ‰ — Diet 4 = hay and barley percent proportion of 100:0

vlákniny (NDF), kyslej detergentnej vlákniny (ADF), celulózy a hemicelulózy. Koncentrácia amoniakálneho dusíka sa zvyšovala, čo bolo pravdepodobne spôsobené zvyšujúcim sa množstvom močoviny dodanej do Mc Douglavho pufru. Vplyvom monenzínu bola ovplyvnená celková produkcia unikavých mastných kyselín (UMK) ako aj jednotlivých UMK. Celková produkcia UMK ako aj jednotlivých UMK (kyseliny octovej, propiónovej, n—maslovej, n— a izo—valérovej) sa znižovala a pomer acetát/propionát sa zvyšoval v diétach so stúpajúcim podielom sena. Celková produkcia plynov sa znižovala, podobne aj produkcia CO₂. Produkcia metánu bola prakticky rovnaká vo všetkých fermentačných nádobách umelého bachora RUSITEC (tab. II).

Zo známych stoichiometrických vzťahov v bachore je možné kalkuláciou stanoviť výstupy konečných produktov fermentácie v RUSITECu. V tab. III uvádzame hodnoty týchto ukazateľov konečných produktov fermentácie — využitie glukózy, množstvo fermentovaných hexóz a produkciu adenosíntrifosfátu (ATP). Okrem nich sme kalkuláciou z hodnôt produkcie UMK stanovili pomery energie E₁, E₂ a E₃ ako aj energetickú výťažnosť UMK (E). Vplyvom monenzínu sa znižovala energetická výťažnosť UMK (E) ako aj podiel fermentovanej hexózovej energie na energiu UMK (E₁) so stúpajúcim podielom sena v krmnej dávke. Avšak podiel fermentovanej hexózovej energie metánu (E₂) a na produkciu bakteriálnej hmoty (E₃) sa zvyšoval. Tiež sa znižovala produkcia ATP, množstvo fermentovaných hexóz a využitie glukózy. Monenzín ovplyvnil aj bilanciú metabolického vodíka (H₂). Prejavilo sa to zníženou produkciou, utilizáciou a návratnosťou H₂ v diétach so stúpajúcim podielom sena. Metabolický H₂ bol najviac využitý na produkciu bakteriálnej hmoty a najmenej na produkciu metánu (tab. IV).

Na základe výsledkov stanovenia mikrobiálnej sušiny (PDM), effluentu a DAP v zbytkovom krmive sme stanovili celkovú produkciu mikrobiálnej sušiny počas fermentácie v RUSITECu. V tab. IV sme ju vyjadrili v g . kg⁻¹ strávenej DM krmnej dávky podobne ako produkciu ATP v mol . kg⁻¹ strávenej DM. Pomocou týchto ukazateľov sme vypočítali účinnosť syntézy mikrobiálnej hmoty — Y_{ATP}. Vplyvom monenzínu sa produkcia mikrobiálnej sušiny a produkcia ATP . kg⁻¹ strávenej DM ako aj Y_{ATP} zvýšila so stúpajúcim podielom sena v krmnej dávke.

DISKUSIA

Bachor simulujúca technika (RUSITEC) umožňuje sledovať bachorovú fermentáciu substrátu za kontrolovateľných podmienok *in vitro*. Fermentácia substrátu (sena a jačmeňa) bola v tomto experimente ovplyvnená dodaním monenzínu. Prejavilo sa to významným znížením stráviteľnosti DM a detergentnej vlákniny — NDF, ADF, celulózy a hemicelulózy pri stúpajúcom podieli sena v krmnej dávke. Hodnoty stráviteľnosti DM vo V₁, V₂, V₃ a V₄ boli značne nižšie ako hodnoty stráviteľnosti DM podobných diét bez dodania monenzínu v pokusoch uskutočnených v RUSITECu (Wallace a i., 1980; Czerkawski a i., 1984; Jalč a i., v tlači). Monenzín významne ovplyvnil produkciu i jednotlivých UMK. So

II. Vplyv monenzínu na mol % unikavých mastných kyselín [UMK] a produkciu plynov [metánu a CO₂] — The effect of monensin on percent mol of volatile fatty acid [UMK] and production of gases [methane and CO₂]

Ukazovateľ ¹	Diéta 1	Diéta 2	Diéta 3	Diéta 4
mol % kyseliny octovej ²	37,24 ±1,04	39,17 ±0,51	42,30 ±0,32***	47,00 ±0,31***
mol % kyseliny propiónovej ³	50,03 ±1,37	50,85 ±0,46	48,42 ±0,73	42,98 ±0,31***
mol % kyseliny n-maslovej ⁴	3,33 ±0,20	3,36 ±0,07	3,47 ±0,15	5,21 ±0,07***
mol % kyseliny n-valérovej ⁵	8,49 ±0,28	5,30 ±0,46***	4,69 ±0,25	3,83 ±0,18***
mol % kyseliny izo-valérovej ⁶	0,86 ±0,02	0,95 ±0,06	0,84 ±0,07	0,92 ±0,07
Celková produkcia plynov ⁷ [l. deň ⁻¹]	2,13 ±0,07	1,83 ±0,05**	1,80 ±0,01***	1,53 ±0,02***
Produkcia metánu ⁸ [mmol. deň ⁻¹]	0,37 ±0,07	0,94 ±0,50	0,33 ±0,05	0,53 ±0,16
Produkcia ⁹ CO ₂ [mmol. deň ⁻¹]	26,74 ±2,44	18,50 ±2,75*	12,49 ±1,40***	6,38 ±1,19***

¹characteristic, ²mol % of acetic acid, ³mol % of propionic acid, ⁴mol % of n-butyric acid, ⁵mol % of n-valeric acid, ⁶mol % of isovaleric acid, ⁷total production of gases, ⁸methane production, ⁹CO₂ production

III. Vplyv monenzínu na konečné produkty fermentácie a energetickú výťažnosť UMK — The effect of monensin on the final products of fermentation and energy yield of VFA

Ukazovateľ ¹	Diéta 1	Diéta 2	Diéta 3	Diéta 4
E [%]	88,35 $\pm$ 0,64	87,99 $\pm$ 0,27	86,60 $\pm$ 0,29*	83,95 $\pm$ 0,16***
E ₁ [%]	89,99 $\pm$ 0,49	88,83 $\pm$ 0,26	87,54 $\pm$ 0,15	84,83 $\pm$ 0,20***
E ₂ [%]	1,13 $\pm$ 0,94	1,48 $\pm$ 0,25	2,76 $\pm$ 0,18**	5,50 $\pm$ 0,10***
E ₃ [%]	38,76 $\pm$ 0,18	39,80 $\pm$ 0,35**	39,83 $\pm$ 0,18**	39,32 $\pm$ 0,08*
Využitie glukózy ² [mmol . deň ⁻¹]	30,12 $\pm$ 0,98	27,29 $\pm$ 0,78*	20,72 $\pm$ 0,43***	19,09 $\pm$ 0,86***
Fermentované hexózy ³ [mmol . deň ⁻¹]	25,52 $\pm$ 0,92	24,44 $\pm$ 0,71	18,86 $\pm$ 0,78***	17,73 $\pm$ 1,75**
Produkcia ATP ⁴ [mmol . deň ⁻¹]	139,87 $\pm$ 5,52	129,00 $\pm$ 3,73	97,23 $\pm$ 2,09***	87,06 $\pm$ 8,51***

¹characteristic, ²glucose utilization, ³fermented hexoses, ⁴ATP production

IV. Vplyv monenzínu na mikrobiálny rast a návratnosť vodíka — The effect of monensin on microbial growth and hydrogen recovery

Ukazovateľ ¹	Diéta 1	Diéta 2	Diéta 3	Diéta 4
Produkcia mikrobiálnej DM v g na 1 kg strávenej DM ²	169,13 ±3,25	203,71 ±2,23	179,25 ±3,20	190,48 ±2,04
Produkcia ATP v mol na 1 kg strávnej DM ³	17,46 ±0,45	18,08 ±0,67	16,44 ±0,31	17,60 ±1,86
Y _{ATP} [g · mol ⁻¹]	9,72 ±0,39	11,30 ±0,33**	10,90 ±0,24*	10,32 ±1,17*
Vodíková bilancia ⁴ [mmol · deň]				
Produkcia ⁵ H ₂	88,61 ±2,37	80,61 ±2,25	62,33 ±1,29	59,79 ±5,81
Utilizácia ⁶ H ₂				
na produkciu UMK ⁷	76,53 ±3,39	66,15 ±2,09*	47,44 ±1,14***	39,44 ±3,88***
na produkciu metánu ⁸	1,51 ±0,55	2,09 ±0,96	1,27 ±0,45	2,13 ±0,65
na produkciu bakteriálnej hmoty ⁹	10,94 ±0,01	11,77 ±0,02***	8,57 ±0,01***	7,65 ±0,006***
Celkove ¹⁰	88,73 ±3,65	79,60 ±2,10	57,04 ±1,40***	49,23 ±3,62***
Návratnosť ¹¹ H ₂ [%]	100,13	98,74	91,51	82,34

¹characteristic, ²production of microbial DM in g per 1 kg digested DM, ³ATP production in mol per 1 kg digested DM, ⁴hydrogen balance, ⁵production, ⁶utilization, ⁷in relation to VFA production, ⁸to methane production, ⁹to bacterial matter production, ¹⁰total, ¹¹recovery

stúpajúcim podielom sena v diéte sa znižovala produkcia UMK. Dodaním monenzínu sa znížili hodnoty produkcie UMK, kyseliny octovej, n—maslovej a izo-valérovej a pomeru acetát/propionát a zvýšili hodnoty produkcie kyseliny propiónovej a n—valérovej v porovnaní k produkcii celkových i jednotlivých UMK pri fermentácii podobných diét bez dodania monenzínu (Jalč a i., v tlači; Wallace a i., 1981; Stanier a Davis, 1981).

Celková produkcia plynov sa znižovala so stúpajúcim podielom sena v diéte. Produkcia metánu a CO_2 bola vplyvom monenzínu značne znížená. Produkcia metánu a CO_2 pri fermentácii diét v RUSITECu je okolo 10—11, resp. 22—49 mmol. deň⁻¹ (Czerkawski a Breckenridge, 1985; Czerkawski a i., 1984).

Je známa skutočnosť, že vplyvom monenzínu nastáva pokles tvorby metánu a vzostup kyseliny propiónovej. Pri bachorovej fermentácii je pri tvorbe metánu a propionátu opačný vzťah, čo vyplýva z určitej konkurencie obidvoch systémov odstraňovania vodíka. Monenzín nemá priamy inhibičný vplyv na metanogénne baktérie, ale potláča rast baktérií produkujúcich acetát, butyrát a odvádza metabolický vodík z metánu do propionátu (Van Nevel a Demeyer, 1977).

V súlade s tým sú aj naše výsledky týkajúce sa využitia metabolického vodíka (H_2), ktorý bol najviac využívaný na produkciu UMK, potom na produkciu bakteriálnej hmoty a najmenej na produkciu metánu. So stúpajúcim podielom sena v diéte ako aj vplyvom monenzínu sa produkcia, utilizácia a návratnosť H_2 znižovala (tab. IV). Podobné výsledky dosiahli aj Wallace a i. (1981). Kalkuláciou návratnosti metabolického vodíka sme uskutočnili podľa stoichiometrie popísanej autormi Marty a Demeyer (1973) a Demeyer a Van Nevel (1975).

Zo stoichiometrie bachorovej fermentácie je možné vypočítať konečné produkty fermentácie v RUSITECu (Czerkawski, 1986) a energetickú výťažnosť UMK (Orskov a i., 1986). Pri fermentácii diét obsahujúcich seno a koncentrát sa vplyvom dodania 2,5 a 10 mg monenzínu (Jalč a i., v tlači), resp. 0,5 mg monenzínu (Stanier a Davis, 1981) zvýšila výťažnosť energie UMK (E), E_1 a E_3 a znížilo E_2 . V tomto experimente bola vyššia účinnosť energie UMK (E) a E_1 v koncentrátovej diéte (V_1) než v objemových diétach (V_2 , V_3 a V_4) a nižšia E_2 a E_3 . Ostatné ukazovatele konečných produktov fermentácie v umelom bachore — využitie glukózy, produkcia ATP a množstvo fermentovaných hexóz vykazovali vyššie hodnoty v koncentrátovej diéte (V_1) oproti objemovým diétam. Jednotkou miery energie vytvorenej počas fermentácie je ATP. Na základe produkcie ATP a produkcie mikrobiálnej biomasy je možné stanoviť účinnosť syntézy mikrobiálnej hmoty — Y_{ATP} . Czerkawski (1986) uvádza hodnotu Y_{ATP} 10,5 pre koncentrátové a miešané diéty a 7,0 pre objemové diéty. Wallace a i. (1981) uvádzajú hodnotu Y_{ATP} 9,8 a 10,9 pri fermentácii sena koncentráta (50 : 50 %). Vplyvom monenzínu (33 mg. deň⁻¹) sa Y_{ATP} zvýšilo na 10,6 resp. 11,2. V našom experimente bola zistená najvyššia účinnosť syntézy mikrobiálnej hmoty pri fermentácii diéty obsahujúcej 60 % a 40 % koncentráta. Nižšie, avšak podobné hodnoty Y_{ATP} boli stanovené pri fermentácii ostatných diét.

Záverom je možné konštatovať, že monenzín ovplyvnil fermentáciu diét s rôznym obsahom objemového krmiva a koncentráta, čo sa preja-

vílo hlavne zvýšenou produkciou propionátu, redukovanou produkciou metánu ako aj zmenami v produkcii konečných produktov fermentácie.

Literatúra

- CONWAY, E. J. — O'MALLEY, F.: Microdiffusion methods, ammonia and urea using buffered absorbents. *Biochem. J.*, 36, 1948, s. 655—661.
- COTTEY, B. G. — BOUCQUE, C. V.: Rapid method from the gas chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. *J. agric. fd. Chem.*, 16, 1968, s. 105—107.
- CZERKAWSKI, J. W.: Methods for determining 2—6 diaminopimelic acid and 2—aminoethylphosphonic acid in gut contents. *J. Sci. Fd Agric.*, 25, 1974, s. 45—55.
- CZERKAWSKI, J. W.: An introduction to rumen studies. Oxford — New York — Toronto — Sydney — Frankfurt, Pergamon press 1986.
- CZERKAWSKI, J. W. — BRECKENRIDGE, G.: Design and development of a long term simulation technique (RUSITEC). *Brit. J. Nutr.*, 38, 1977, s. 371—384.
- CZERKAWSKI, J. W. — BRECKENRIDGE, G.: Metabolism of protein supplements studied by the rumen simulation technique (RUSITEC). *Arch. Tierernähr.*, 35, 1985, s. 261—277.
- CZERKAWSKI, J. W. — CLAPPERTON, J. L.: Analysis of gas produced metabolism of microorganisms. *Lab. Pract.*, 17, 1968, s. 994—996.
- CZERKAWSKI, J. W. — PIATKOVA, M. — BRECKENRIDGE, G.: Microbial metabolism of 1,2—propanediol studied by the rumen simulation technique (RUSITEC). *J. appl. Bact.*, 56, 1984, s. 81—94.
- DEMEYER, D. I. — VAN NEVEL, C. J.: Methanogenesis: an integrated part carbohydrate fermentation and its control. In: McDONALD, I. W. — WARNER, A. C. (eds): Digestion and metabolism in the ruminant. The University of New England, Armidale, Australia, Publishing Unit 1975, s. 366—382.
- GOERING, H. K. — VAN SOEST, P. J.: Forage fiber analyses. U.S.D.A., Agriculture Handbook, č. 379, 1970, s. 1—20.
- HANSON, T. L. — KLOPFENSTEIN, T. J.: Monensin, protein source and protein levels for growing steers. *J. anim. Sci.*, 48, 1979, s. 474—479.
- CHALUPA, W. — CORBETT, W. — BRETHOURE, J. R.: Effects of monensin and amiloron on rumen fermentation. *J. anim. Sci.*, 51, 1980, s. 170—176.
- JALČ, D. — BARAN, M. — VENDRÁK, T. — SIROKA, P.: Effects of monensin on fermentation of hay and wheat bran by the rumen simulation technique (RUSITEC) part I. Basal fermentation parameters. *Arch. Tierernähr.*, v tlači.
- JOUANY, J. P. — SENAUD, J.: Utilisation du monensin dans la ration des ruminants. II. effects sur les fermentations et la population microbienne du rumen. *Ann. zootech.*, 27, 1978, s. 61—74.
- MARTY, R. J. — DEMEYER, D. I.: The effects of inhibitors of methane production on fermentation pattern and stoichiometry *in vitro* using rumen contents from givem molasses. *Brit. J. Nutr.*, 30, 1973, s. 369—376.
- McDOUGALL, E. I.: Studies on rumen saliva, 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.*, 43, 1948, s. 99—109.
- ORSKOV, E. R. — FLATT, W. P. — MOE, P. W.: Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of VFA formations in ruminants. *J. Dairy Sci.*, 51, 1986, s. 1429—1435.
- POOS, M. I. — HANSON, T. L. — KLOPFENSTEIN, T. J.: Monensin effects on diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein synthesis. *J. anim. Sci.*, 48, 1979, č. 6, s. 1516—1524.
- STANIER, G. — DAVIS, A.: Effects of the antibiotic monensin and an inhibitor of methanogenesis on in continuous rumen fermentations. *Brit. J. Nutr.*, 46, 1981, s. 567—578.
- THORNTON, J. H. — OWENS, F. N. — LEMENAGER, R. P. — TOTUSEK, R.: Monensin and ruminal methane production. *J. anim. Sci.*, 43, 1976, s. 336.
- VAN NEVEL, C. J. — DEMEYER, D. I.: Effects of monensin on rumen metabolism *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 1977, s. 251—257.
- WALLACE, R. J. — CHENG, K. J. — CZERKAWSKI, J. W.: Effect of monensin on fermentation characteristics of the artificial rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 1980, s. 672—674.

WALLACE, R. J. — CZERKAWSKI, J. W. — BRECKENRIDGE, G.: Effect of monensin on fermentation of basal rations in the rumen simulation technique (RUSITEC). *Brit. J. Nutr.*, 46, 1981, s. 131–147.

Došlo dňa 19. 1. 1990

JALČ, D. — BARAN, M. — VENDRÁK, T. SIROKA, P. [Institute of Animal Physiology of the Slovak Academy of Sciences, Košice]: *The effect of monensin on the fermentation of feed with different hay and concentrate proportions in (RUSITEC) rumen pouch*. *Veter. Med.*, (Praha), 36, 1991: 29–38.

An experiment was conducted with rumen pouch (RUSITEC — Rumen Simulation Technique). In four fermentation vessels (V), percent proportions of hay and barley were as follows: V₁ — 40:60, V₂ — 60:40, V₃ — 80:20 and V₄ — 100:0. Every day 5 mg of monensin dissolved in 1 ml 96% ethanol were added to each fermentation vessel. All diets were isonitrogenous, and after an addition of urea the crude protein (CP) content made 13% in each diet. The experiment lasted 12 days: so called steady state period took the first six days when the fermentation conditions were stabilized. Monensin reduced dry matter digestibility, production of total volatile fatty acids, acetic acid, n-butyric and isovaleric acids and acetate:propionate proportion, and it increased the production of propionic and n-valeric acids. The production of methane and CO₂ decreased. The higher proportion of hay in diets decreased dry matter digestibility, digestibility of detergent fibre, total and individual volatile fatty acids, CO₂, methane energy yield of volatile fatty acids (E), glucose utilization, production of adenosine triphosphate and production of fermented hexoses. The production, utilization and recovery of metabolic hydrogen also decreased. The effectiveness of microbial matter synthesis ($Y_{ATP} = 11.3$) was highest during the fermentation of feed containing 60% hay and 40% barley.

monensin; rumen pouch (RUSITEC); volatile fatty acids; CO₂; methane; final products of fermentation

Adresa autorov:

MVDr. Dušan Jalč, CSc., MVDr. Miroslav Baran, CSc., MVDr. Tibor Vendrač, RNDr. Peter Siroka, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Duklianských hrdinov 1/B, 040 01 Košice

LYSOZOMÁLNÍ AKTIVITA ENTEROCYTŮ TENKÉHO STŘEVA SELAT EXPERIMENTÁLNĚ INFIKOVANÝCH KOKCIDIÍ *ISOSPORA SUIS*

M. Kudweis, Z. Lojda, I. Juliš

KUDWEIS, M. — LOJDA, Z. — JULIŠ, I. (Výzkumná a diagnostická histochemická laboratoř nemocnice, Český Krumlov; Laboratoř pro histochemii při lékařské fakultě Univerzity Karlovy, Praha): *Lysozomální aktivita enterocytů tenkého střeva selat experimentálně infikovaných kokcií Isospora suis*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (1): 39—50.

U gnotobiotických a konvenčních selat experimentálně infikovaných první den po porodu (DPP) oocystami kokcie *Isospora suis* jsme studovali lysozomální aktivitu enterocytů sliznice tenkého střeva. Pro znázornění lysozómů jsme použili metodu k průkazu aktivity β -D-glukuronidázy (EC. 3.2.1.31.). Selata byla infikována odlišnou infekční dávkou oocyst (100 000 oocyst u selat gnotobiotických a 200 000 oocyst u selat konvenčních). U gnotobiotických infikovaných selat jsme aktivitu β -D-glukuronidázy v lysozómech enterocytů studovali v období 3.—11. den po infekci (DPI) a u infikovaných selat konvenčních v období 2.—10. DPI. U kontrolních selat, ve skupině gnotobiotických zvířat ve věku 2—5 dnů a v sestavě zvířat konvenčních ve věku 4—7 dnů jsme prokázali, že vyšší aktivitu β -D-glukuronidázy mají lysozómy enterocytů sliznice střevní u kontrolních selat gnotobiotických (+5,30 průměrné hodnoty denzity, D_x). U infikovaných gnotobiotických a konvenčních selat jsme zjistili, že vývoj aktivity β -D-glukuronidázy prodělává celkem tři etapy v průběhu onemocnění. Dvě fáze jsou doprovázeny značným zvýšením aktivity enzymu (3.—9. DPI u selat gnotobiotických, 2.—3. a 7.—9. DPI u selat konvenčních). Třetí etapa, zřetelná zejména u infikovaných selat konvenčních, je charakterizována výrazným snížením aktivity β -D-glukuronidázy, a to až pod úroveň kontrolních zjištění (10. a zejména 11. DPI u selat gnotobiotických, 4.—6. a 10. DPI u selat konvenčních). Topograficky dvě fáze vzestupu i etapa poklesu aktivity β -D-glukuronidázy postihují celé tenké střevo bez predispozičního defektu enzymu v jednotlivých úsecích tenkého střeva.

experimentální infekce; histochemie; β -D-glukuronidáza; lysozómy; *Isospora suis*

Průjemové onemocnění v průběhu klinické kokcidiózy sajících selat tívá obvykle 1—5 dnů (Roberts a Walker, 1982).

Patologické změny se při experimentální kokcidióze sajících selat mohou vyskytovat v podstatě kdekoli v průběhu tenkého střeva, obvykle jsou však těžší ve středním a zadním jejunu a také v ileu (Harleman a Meyer, 1985).

Obecným znakem histologických změn je různě pokročilá atrofie střevních klků (Robinson aj., 1983). Atrofované klky jsou zpravidla kryty kuboidálními nebo dlaždicovými buňkami, přičemž Lieberkühnovy krypty jsou hyperplastické (Robinson aj., 1983).

V experimentech má choroba bifázický průběh (Harleman a Meyer, 1985). Patogeneze enterálních změn při experimentální isosporóze u gnotobiotických a konvenčních selat probíhá ve dvou fázích s dvojí alterací sliznice tenkého střeva, na kterou navazují fáze reparace a regenerace patologických změn (Vítovec a Koudela, 1990).

Studium aktivity lysozomálních enzymů enterocytů je vhodným markerem pro posouzení funkčního stavu a úrovně vyzrálosti absorpčních buněk v průběhu střevních onemocnění nejružnější etiologie (Trier a Rubín, 1965).

Lysozomy jsou tělíska o průměru 0,1–1,0 μm , které funkčně a strukturně patří do skupiny enzymaticky bohatých cytozómů.

V enterocytech sliznice tenkého střeva jsou lysozomy lokalizovány přednostně v supranukleární oblasti buňky, méně v oblasti infranukleární (Lojda, 1969a, b; Kobayashi aj., 1980).

Funkce lysozómů není ještě v plném rozsahu známa. Předpokládá se jejich účast na enzymatickém odbourávání různých látek (např. tuků) intracelulárního i extracelulárního původu (Biempica aj., 1962), které se do buňky dostávají pinocytózou a fagocytózou (Trier a Rubín, 1965). Jednoznačný podíl lysozómů na resorpci tuků se však ani v pozdějších studiích prokázat nepodařilo (Barka, 1964).

Pro účast v enzymatickém štěpení svědčí bohatá enzymatická sada, obsažená v lysozómech. Obsahují vysokou aktivitu kyselé fosfatázy, E 600 rezistentní termolabilní esterázy, acetyl- β -D-glukózaminidázy a β -D-glukuronidázy (Lojda, 1966a, 1974). V lysozómech jsou pravděpodobně lokalizovány také β -D-glukosidáza a β -galaktosidáza (Lojda, 1966a).

Pro studium lysozomální aktivity se za nejvhodnější považuje průkaz β -D-glukuronidázy, která na metodicky vhodně zpracovaném materiálu dává nejlepší topochemickou lokalizaci (Lojda, 1967, 1974). Nepatrné množství tohoto enzymu je vázáno také na endoplazmatické retikulum, ovšem bez přesné a výrazné topochemie (Lojda aj., 1979a).

Jak bylo uvedeno výše, aktivita β -D-glukuronidázy je v enterocytech zdravého tenkého střeva prokazatelná zejména v supranukleární oblasti (Lojda, 1969). Tuto lokalizaci dokládají dále práce Lojdy (1974) provedené na sliznici tenkého střeva lidských novorozenců a práce Kudweise a Lojdy (1989a, b), kteří aktivitu β -D-glukuronidázy studovali ve sliznici tenkého střeva gnotobiotických a konvenčních selat.

Většina enterocytárních enzymů prodělává ve své aktivitě vývoj, který je zpravidla dokončen po vynoření enterocytu ze střevní krypty a jeho dislokaci na bázi střevního klku (Havránková a Lojda, 1977; Lojda, 1983a). Ani po této enzymatické diferenciaci není aktivita enzymů enterocytu stálá a mění se například v průběhu dne (Růžičková aj., 1978).

Lysozomální enzymy, včetně β -D-glukuronidázy prodělávají ve své aktivitě během nejružnějších patologických stavů variabilní změny (Fábry, 1959; Lojda, 1966b, 1983b; Lojda aj., 1970; Ross, 1980; Kudweis aj., 1987).

Cílem naší práce bylo na lysozomálním, topochemicky nejlépe lokalizovaném enzymu prokázat značnou pestrost v aktivitě lysozomálních enzymů během experimentální infekce gnotobiotických a konvenčních selat kokcií *I. suis*.

Práce přináší i některé nové poznatky o funkčním a strukturálním (organelovém) poškození absorpčních buněk sliznice střevní v době urychlené diferenciacie buněk sliznice střevní, o které jsme referovali dříve (Kudweis a Lojda, 1989c; Kudweis aj., 1989a, b, c).

MATERIÁL A METODA

Přehled experimentálně infikovaných gnotobiotických a konvenčních selat kokcidí *I. suis*, jejichž tkáň sliznice tenkého střeva jsme vyšetřili, je uvedena v tab. I. Provedení infekce a způsob odběru vzorků tenkého střeva jsou popsány jinde (Kudweis aj., 1989b, c).

Vzorky byly ihned po utracení selat a odběru rychle zmrazeny na suchém ledu a do zpracování uloženy v mrazicím pultu s teplotou -60 až -70°C . Z takto připravených zmrazených bločků tenkého střeva byly pořízeny sériové řezy na kryostatů (Frigocut, Mod. 2700, Reichert-Jung, SRN) o tloušťce do $7\text{ }\mu\text{m}$.

Řezy byly přeneseny na teplá podložní skla, na nichž ihned roztály a přischly. Průkaz β -D-glukuronidázy jsme prováděli podle Lojdy (Lojda a Frič, 1967; Lojda aj., 1979a). Jako substrátu jsme použili naftol-AS-BI- β -D-glukuronid (4.0 mg), který jsme po rozpuštění v malém množství dimethylformamidu (DMF) smíchali s pufovaným roztokem hexazo-p-rosanilinu (HPR) v poměru 0.7 ml HPR a $20\text{ ml } 0.2\text{M}$ octanu sodného. Přípravu HPR jsme provedli podle Lojdy aj. (1979a). pH inkubačního média bylo upraveno na 5.0 – 5.2 . Řezy jsme inkubovali při teplotě 0 – 4°C (v ledničce) tak, aby doba inkubace nepřesáhla 12 hodin.

Aktivitu β -D-glukuronidázy v enterocytech jsme vyhodnotili na počítačem řízeném (SAPI-ZPS 2) skanovacím a integrujícím mikrodenzitometru VICKERS M86 při standardním použití objektivu $20\times$ a clony č. 2 (průměr $2\text{ }\mu\text{m}$).

Denzitu β -D-glukuronidázy jsme měřili při vlnové délce 540 – 560 nm , která odpovídala při dané konfiguraci přístroje maximální absorpci deponovaného reakčního produktu.

Denzitu β -D-glukuronidázy v enterocytech jsme měřili tak, že jsme prohlédli 15 sériových řezů každého úseku tenkého střeva a vyhodnotili v jednotlivých řezech 10 – 15 střevních klků. Denzitu jsme pak měřili v 15 – 20 enterocytech (se zaměřením na převažující lokalizaci β -D-glukuronidázy) v rozsahu celého obvodu každého prohlíženého střevního klku.

I. Přehled zpracovaného materiálu — A survey of the treated material

Gnotobiotická selata ¹			Konvenční selata ²		
sele ■	DPP _{in} *	DPI _u **	sele ■■	DPP _{in}	DPI _u
ISg 4	1	3	IS 22	1	2
ISg 7	1	4	IS 14	1	3
ISg 22	1	5	IS 16	1	4
ISg 25	1	6	IS 20	1	5
ISg 12	1	7	IS 24	1	6
ISg 13	1	8	IS 30	1	7
ISg 14	1	9	IS 33	1	8
ISg 17	1	10	IS 34	1	9
ISg 21	1	11	IS 35	1	10
K1–K4	0	2–5 ■*	K1–K4	0	4–7* ■

¹gnotobiotic piglets, ²conventional piglets

■ ISg — *Isospora suis* — gnotobiotické; ■■ IS — *Isospora suis* — ■ ISg — *Isospora suis* — gnotobiotic; ■■ IS — *Isospora suis*

* infekce ve dny po porodu; ** utracení ve dny po infekci — * infection on days after birth; ** killing on days after infection

■* věk kontrolních selat gnotobiotických a *■■ konvenčních — ■* age of gnotobiotic and *■■ conventional control piglets

Získané údaje jsme statisticky zpracovali a stanovili $D\bar{x}$ β -D-glukuronidázy v enterocytech jednotlivých úseků tenkého střeva.

$D\bar{x}$ β -D-glukuronidázy jsme v paranukleární a infranukleární zóně absorpčních buněk nehodnotili, vzhledem k nízkému počtu lysozómů v těchto oblastech enterocytů.

VÝSLEDKY

Pro objektivní studium lysozomální aktivity enterocytů jsme vyhodnotili aktivitu β -D-glukuronidázy ve sliznici tenkého střeva infikovaných selat.

Při přípravě této práce jsme použili i histochemickou detekci ostatních lysozomálních enzymů (kyselé fosfatázy a acetyl- β -D-glukosaminidázy). Zjistili jsme, že topochemie je nejpřesnější v případě β -D-glukuronidázy, což dokumentuje v porovnání s dalšími snímky obr. 1 (reakce na kyselou fosfatázu).

U kontrolních selat jsme prokázali vyšší aktivitu β -D-glukuronidázy v enterocytech sliznice střevní gnotobiotických zvířat (+5,30 $D\bar{x}$ ve srovnání s kontrolními selaty konvenčními).

Ve střevních kryptách jsme reakční produkt β -D-glukuronidázy nezjistili (obr. 2). Rozdíl, který jsme prokázali ve vybavení enterocytů střevní sliznice mezi konvenčními a gnotobiotickými selaty, zřejmě souvisí s odlišným uspořádáním buněčných organel (lysozómů), zejména s ohledem ke specifickým podmínkám bezmikrobiálního prostředí vnitřního povrchu střeva u gnotobiotických selat. Přesnou odpověď by podala studie sliznice střevní pomocí elektronové mikroskopie. Věkový rozdíl mezi kontrolními selaty nepovažujeme za rozhodující vzhledem na shodné výsledky při vyšetření kontrolních selat ve stejném věku (5 dnů).

Topograficky je aktivita u kontrolních selat rozložena pravidelně. U gnotobiotických kontrolních selat jsme mírnou převahu aktivity β -D-glukuronidázy zaznamenali v duodenu.

U obou skupin experimentálně infikovaných selat jsme zjistili tři etapy ve vývoji aktivity β -D-glukuronidázy. Dvě z těchto etap jsou charakterizovány výrazným vzestupem aktivity β -D-glukuronidázy; třetí etapa je doprovázena naopak snížením aktivity β -D-glukuronidázy, a to až pod úroveň kontrolních zjištění.

Rozdíl mezi infikovanými gnotobiotickými a konvenčními selaty spočívá v odlišném, časově ohraničeném průběhu jednotlivých fází vývoje aktivity β -D-glukuronidázy v enterocytech tenkého střeva.

U infikovaných gnotobiotických selat probíhá první a druhá etapa (EA I; EA II) vzestupu aktivity β -D-glukuronidázy v období 3.—9. DPI (obr. 3) s přerušením trvalého zvyšování aktivity enzymu 6. (resp. 7.) DPI. Třetí fáze (fáze poklesu aktivity β -D-glukuronidázy; EA III) následuje 10. a zejména 11. DPI (obr. 4). V průběhu EA I a EA II jsme nejvyšší aktivitu β -D-glukuronidázy prokázali v duodenu, s výjimkou počátku EA III (8. DPI), kdy jsme zjistili nejvíce reakčního produktu β -D-glukuronidázy v ileu.

Vývoj $D\bar{x}$ β -D-glukuronidázy v enterocytech sliznice jednotlivých úseků tenkého střeva infikovaných gnotobiotických selat uvádí tab. II (část A) a její průběh je znázorněn na obr. 5.

U infikovaných konvenčních selat jsme EA I prokázali v období 2.—3. DPI a EA II 7.—9. DPI. EA III je tudíž u konvenčních infikovaných selat výraznější. Ve srovnání s přechodným pozastavením zvyšování aktivity

β -D-glukuronidázy 6. (resp. 7.) DPI u infikovaných selat gnotobiotických je charakterizována EA III u konvenčních infikovaných selat poklesem aktivity β -D-glukuronidázy mezi EA I a EA II (4.—6. DPI; obr. 6). EA III pokračuje 10. DPI, kdy snížení dosahuje hodnot 50,31 % (obr. 7) v porovnání s kontrolními údaji (104,37—88,12 ve stejném období a 11. DPI u infikovaných selat gnotobiotických).

Všechny tři etapy ve vývoji aktivity β -D-glukuronidázy enterocytů sliznice tenkého střeva probíhají u infikovaných selat konvenčních vyrovnaněji a hodnoty $D\bar{x}$ dosahují minimálních odchylek.

$D\bar{x}$ β -D-glukuronidázy enterocytů tenkého střeva infikovaných konvenčních selat v jednotlivé DPI dokumentuje tab. II (část B) a obr. 8.



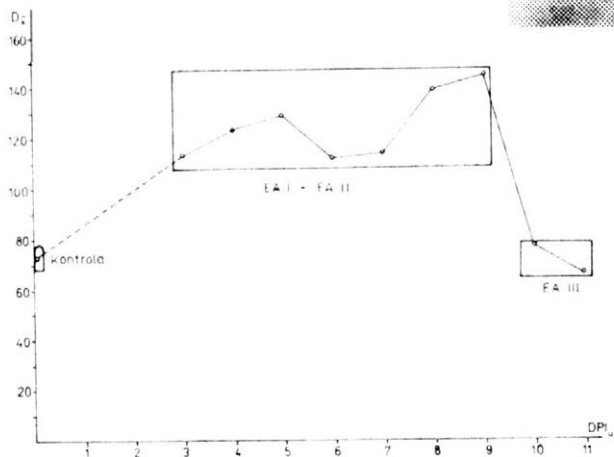
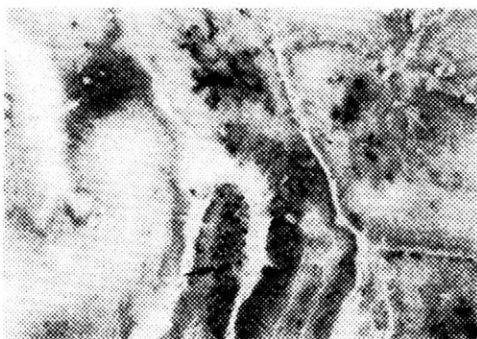
1. Reakce na kyselou fosfatázu. Reakční produkt je lokalizován prakticky ve všech třech oblastech enterocytu bez přesné topiky v lysozómech. Sele K4-gnotobiotické, věk pět dnů, úsek středního jejunu (zv. 200 $\times$) — Reaction to acid phosphatase. The reaction product is located practically in all three regions of enterocytes without any exact topical characteristics in lysosomes. Piglet K4-gnotobiotic, age of five days, middle jejunum (enlarged 200 $\times$)

2. Reakční produkt β -D-glukuronidázy je přesně topochemicky lokalizován na lysozomy, zejména v supranukleární oblasti enterocytů (→). Sele K2 — konvenční, věk pět dnů, úsek středního jejunu (zv. 100 $\times$) — The reaction product of β -D-glucuronidase can be located in an exact topochemical manner in lysosomes, mainly in the supranuclear region of enterocytes (→). Piglet K2 — conventional, age of five days, middle jejunum (enlarged 100 $\times$)



3. Značné zvýšení aktivity β -D-glukuronidázy 3. DPI u gnotobiotických selat (ISg 4) v úseku duodena. Střevní krypty ani u infikovaných selat reakční produkt neobsahují [*; viz text; zv. 100 krát] — A great increase in the β -D-glucuronidase activity on DAI 3 in gnotobiotic piglets (ISg 4) in duodenum. The reaction product is not contained in intestinal crypts in the infected piglets [*; cf. the text; enlarged 100 $\times$]

4. Výrazné snížení aktivity β -D-glukuronidázy 11. DPI (sele ISg 21) v úseku středního jejunum. Také při této nízké aktivitě si enzym uchovává lysozomální lokalizaci (→), zv. 200 $\times$ — A steep fall of the β -D-glucuronidase activity on DAI 11 (piglet ISg 21) in middle jejunum. At this activity the enzyme has also its lysosomal location (→), enlarged 200 $\times$

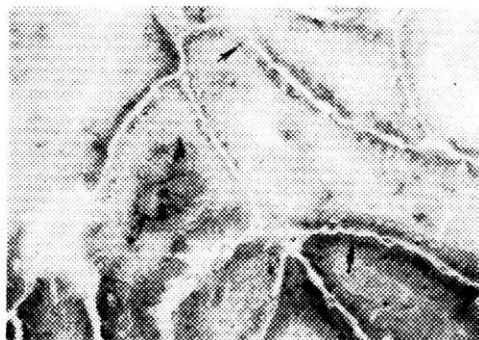


5. Vývoj $D\bar{x}$ ve sliznici tenkého střeva gnotobiotických infikovaných selat — The development of $D\bar{x}$ in the small intestine mucosa of gnotobiotic infected piglets kontrola — control

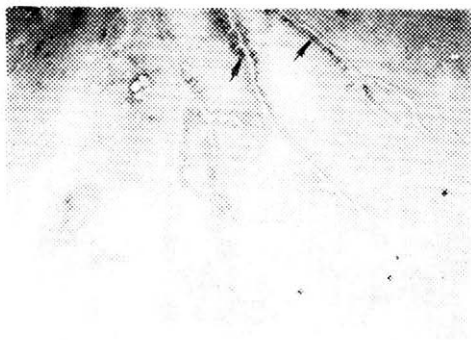
II. Přehled získaných výsledků* — A survey of the results obtained in trials*

Střevo**		DPI2	DPI3	DPI4	DPI5	DPI6	DPI7	DPI8	DPI9	DPI10	DPI11	K1—K4
A	D		110,5	130,4	128,6	110,1	112,5	123,6	147,7	81,3	68,7	77,96
	J ₁		113,9	127,6	126,4	112,4	113,2	123,1	146,3	76,9	66,7	71,20
	J ₂		112,3	120,3	122,7	110,4	112,8	143,8	141,5	73,1	62,8	71,87
	I		108,5	112,1	127,6	111,0	111,0	159,6	136,3	72,8	61,8	72,46
	$\bar{x}$		111,3	122,6	126,2	110,9	112,4	137,5	143,0	76,0	65,0	73,36
B	D	93,1	95,3	52,9	53,8	56,4	109,7	107,0	118,0	33,8		67,16
	J ₁	90,9	96,7	53,1	54,1	55,5	108,7	105,5	118,6	33,9		68,38
	J ₂	92,8	96,5	52,9	53,9	53,3	109,4	113,4	115,5	33,9		68,17
	I	92,5	95,0	53,2	53,3	44,6	113,8	115,6	113,3	34,2		68,54
	$\bar{x}$	92,3	95,9	53,0	53,8	52,4	110,4	110,4	116,3	33,9		68,06

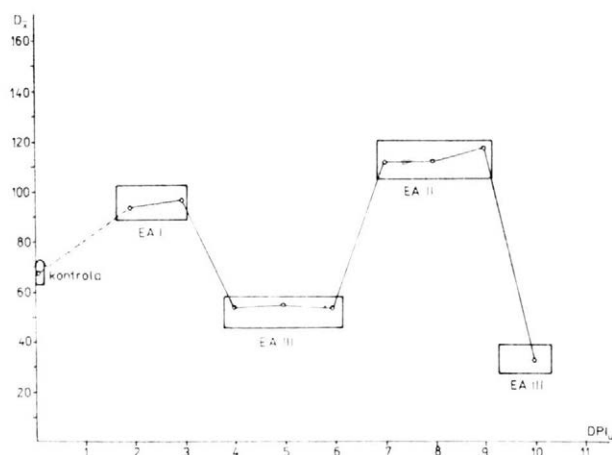
* výsledky v $D\bar{x}$; ** D — duodenum; J₁ — střední jejunum; J₂ — zadní jejunum; I — ileum; A — gnotobiotická selata; B — konvenční selata — * results in $D\bar{x}$; D — duodenum; J₁ — middle jejunum; J₂ — posterior jejunum; I — ileum; A — gnotobiotic piglets; B — conventional piglets



6. Snížení aktivity β -D-glukuronidázy 6. DPI u infikovaných konvenčních selat (IS 24) v úseku zadního jejunu. Zbytková aktivita je lokalizována supranukleárně ($\rightarrow$), zv. 200 $\times$ — A decrease in the β -D-glucuronidase activity on DAI 6 in conventional infected piglets (IS 24) in posterior jejunum. The residual activity is located in the supranuclear region ($\rightarrow$), enlarged 200 $\times$



7. Pokles aktivity β -D-glukuronidázy 10. DPI u infikovaných konvenčních selat (IS 35) v úseku středního jejunu. Lysosomální aktivita je zachována ($\rightarrow$), střevní krypty jsou také u infikovaných konvenčních selat bez reakčního produktu (*; viz obr. 3; zv. 140 $\times$) — A decrease in the β -D-glucuronidase activity on DAI 10 in conventional infected piglets (IS 35) in middle jejunum. The lysosomal activity has been maintained ($\rightarrow$), the intestinal crypts do not either contain any reaction products (*; cf. Fig. 3; enlarged 140 $\times$)



8. Vývoj $D\alpha$ ve sliznici tenkého střeva konvenčních infikovaných selat — The development of $D\alpha$ in the small intestine mucosa in conventional infected piglets
kontrola — control

DISKUSE

Enterocyty (buňky absorpční) se od ostatních buněk sliznice tenkého střeva a také od enteroblastu liší nejen morfologicky, ale také funkčně (Lojda, 1966a, 1967, 1974).

Rozdíl spočívá především v jejich enzymatickém vybavení. Ani po dokončení diferenciaci (tzn. po vynošení enterocyty ze střevních krypt) není jejich enzymatická aktivita konstantní.

Enterocyty sliznice střevní prodělávají další vývoj své enzymatické aktivity s přibývajícím věkem, což dokládají práce L o j d y (1974), provedené při studiu histochemie enterocytů sliznice střevní u lidských novorozenců, H a v r á n k o v é a L o j d y (1977) u morčat a krysa, A n t o n o w i c z e (1979) u lidí a L o j d y aj. (1984) u krysa a miniprasat.

Kromě vývoje enzymatické aktivity enterocytů v závislosti na věku byl prokázán topografický gradient některých enzymů sliznice tenkého střeva včetně lysozomálních enzymů (L o j d a aj., 1979b) a také cirkadiánní rytmus vybraných enzymů (R ů ž i č k o v á aj., 1978).

β -D-glukuronidáza (β -D-glukuronid glukuronohydroláza; EC. 3.2.1.31.) je vedle jiných enzymů (kyselé fosfatázy, acetyl- β -D-glukosaminidázy a E600 resistantní termolabilní esterázy) lokalizována v lysozómech, převážně v supranukleární zóně enterocytů sliznice střevní (L o j d a, 1966a, 1974).

Podílí se na degradaci mukopolysacharidů a má tudíž velmi těsný vztah k sacharidovému metabolismu (L o j d a aj., 1979a). Naše dřívější výsledky s ohledem na úlohu β -D-glukuronidázy vysvětlují funkční stránku poklesu množství mukosubstancí v povrchové vrstvičce hlenu a v pohárkových buňkách během infekce selat kokcií *I. suis*, o kterém jsme již referovali (K u d w e i s aj., 1989b). Jsme toho názoru, že variabilita v množství mukosubstancí ve sliznici střevní je funkčně spojena s časově shodným výkyvem aktivity β -D-glukuronidázy ve sliznici střevní. Při zvýšení aktivity enzymu se mukopolysacharidy odbourávají rychleji a jejich množství klesá. Při snížení aktivity β -D-glukuronidázy je vývoj v množství mukosubstancí sliznice střevní opačný (K u d w e i s aj., 1989a). Vývoj histochemických postupů průkazu β -D-glukuronidázy byl bohatý.

Kromě metody použité v této práci (L o j d a a F r i č, 1967; L o j d a aj., 1979a) je často používána také metoda detekce β -D-glukuronidázy podle Meijerovy školy (M e i j e r a V l o e d m a n, 1973).

Na význam studia aktivity lysozomálních enzymů bylo již upozorněno dříve v souvislosti s průběhem nejrůznějších fyziologických i patologických procesů (H o l m a n, 1973).

Mezi enzymy, které jsou lokalizovány v lysozómech nejlépe tyto organely stopuje β -D-glukuronidáza (L o j d a, 1967, 1974).

Volba studia lysozomálních enzymů a lysozomální aktivity enterocytů v případě experimentální infekce selat kokcií *I. suis*, kdy je prioritně alterováno tenké střevo, vychází ze zjištění, že se během onemocnění tenkého střeva různé etiologie mění vedle aktivity lysozomálních enzymů (L o j d a, 1967, 1975) také počet a struktura samotných lysozómů (T r i e r a R u b i n, 1965; L o j d a, 1967, 1974; R o s s, 1980; N a r i t a aj., 1982).

Změny v aktivitě lysozomálních enzymů nejsou však zpravidla konstantní (L o j d a, 1966a). V některých případech se podařilo zjistit snížení jejich aktivity (S i t k o, 1970), jindy jejich zvýšení (F á b r y, 1959; L o j d a, 1967, 1974; K u d w e i s aj., 1987).

Také v naší práci jsme prokázali ve vývoji aktivity β -D-glukuronidázy značnou variabilitu. Představuje-li tento enzym topochemicky nejvěrněji

lysozomy, pak jsme také doložili výrazné kolísání počtu lysozómů během experimentální infekce.

Vítovec a Koudela (1990) popisují při experimentální infekci selat kokcií *I. suis* dvojí alteraci sliznice střevní (3.—4. DPI a 8.—9. DPI) a dvojí reparaci patologických změn (5.—7. DPI a 10.—12. DPI).

Naše závěry tedy dokládají, že v době alterativních fází nastává zvyšování počtu lysozómů, kdežto v období reparace dochází k poklesu jejich počtu, což je doprovázeno zvýšením nebo snížením Dx reakčního produktu β -D-glukuronidázy ve sliznici tenkého střeva.

Výrazněji se fáze poklesu počtu lysozómů (EA III) projevuje u infikovaných selat konvenčních, kdežto u infikovaných selat gnotobiotických je tato etapa charakterizována pouze pozastavením dalšího zvyšování jejich počtu.

Dosažené výsledky jsou tedy shodné se závěry jiných autorů (Fábry, 1959; Lojda, 1966a, 1967, 1974, 1983b; Sitko, 1970; Kudweis aj., 1987), kteří v některých případech časově omezeného onemocnění nebo fyziologické zátěže konstatovali ve vývoji lysozomálních enzymatických aktivit značnou variabilitu.

Výsledky naší práce dokládají, že absorpční buňky jsou funkčně poškozovány primárně a sekundárně. Předpokládáme, že primární defekt enterocytů způsobují enterální změny vyvolané samotným vlivem kokcidie *I. suis*, sekundární poškození pak urychlená diferenciacie v období první alternativní fáze a počátku první fáze reparativních změn ve dny po infekci, jak je časově vymezují Vítovec a Koudela (1990). Funkční vysvětlení urychlené diferenciacie jsme již doložili (Kudweis aj., 1989a, b, c).

Je možné vyslovit domněnku, že vlivem enterálního působení kokcidie *I. suis* jsou uvolňovány nebo po určité chemické interakci produkovány labilizátory lysozomálních membrán, které mají za následek vyplavování lysozomálních enzymů do cytoplazmy absorpčních buněk, čímž je narušena topika lysozómů.

Současně však zřejmě probíhá syntéza β -D-glukuronidázy ve stávajících lysozómech, což má za následek celkové zvýšení aktivity tohoto lysozomálního enzymu v období morfologických alterací.

Naopak v době pozastavení zvyšování lysozomální aktivity (6., resp. 7. DPI u infikovaných selat gnotobiotických) nebo dokonce snížení této aktivity (4.—6. a 10. DPI u infikovaných selat konvenčních a 11. DPI u infikovaných selat gnotobiotických) se urychlenou diferenciací (Kudweis aj., 1989a, c, d) uvolňují ne zcela vyzrálé enterocyty, které ještě nemají lysozomální aktivitu na fyziologické úrovni a proto se aktivita lysozómů v této době snižuje. Ta se upravuje, v našem případě velice rychle podle předpokladu řady autorů (Lojda, 1974; Antonowicz, 1979; Havránková a Lojda, 1977; Lojda aj., 1984) s přibývajícím věkem.

V souhrnu naše práce dokládá značnou variabilitu lysozomální enzymatické aktivity a současně podává možné vysvětlení funkčního poškození absorpčních buněk ve vztahu k specificky lokalizovanému enzymu.

V neposlední řadě jsou výsledky tohoto studia dalším potvrzením domněnky o patologické, značně urychlené diferenciaci buněk sliznice střevní v období infekčního protozoárního onemocnění.

Literatura

- ANTONOWICZ, I.: The role of enteropeptidases in the digestion of protein and its development in the human fetal small intestine. In: Development of Mammalian Absorptive Processes, Ciba Foundation Symposium 70, Amsterdam — Oxford — New York. Excerpta Med., 1979, s. 169—183.
- BARKA, T.: Electronhistochemical localization of acid phosphatase activity in the small intestine of mouse. J. Histochem. Cytochem., 14, 1964, s. 229—238.
- BIEMPICA, L. — NOVIKOFF, A. — KAHN, B.: Biochemical cytology of absorptive cells in rat intestine. J. Histochem. Cytochem., 12, 1962, s. 654—655.
- FÁBRY, P.: Morfologický obraz adaptace střeva na přerušované hladovění. Českoslov. Fysiol., 8, 1959, s. 183—192.
- HARLEMAN, J. H. — MEYER, R. C.: Pathogenicity of *Isoospora suis* in gnotobiotic and conventionalized piglets. Veter. Rec., 116, 1985, s. 561—565.
- HAVRÁNKOVÁ, E. — LOJDA, Z.: Development of the brush border enzymes of guinea pig and rat enterocytes. Acta Univ. Carol., Monograph., 79, 1977, s. 125—130.
- HOLMAN, J.: Lysosomy a alterace tkání. Veterinářství, 23, 1973, s. 422—424.
- KOBAYASHI, S. — FUJITA, T. — SASAGAWA, T.: The endocrine cells of human duodenal mucosa. An electron microscope study. Arch. histol. jpn., 31, 1980, s. 477—494.
- KUDWEIS, M. — LOJDA, Z.: The small intestine's histochemistry of sucking piglets. Physiol. bohemoslov., 38, 1989a, s. 546.
- KUDWEIS, M. — LOJDA, Z.: The small intestine's histochemistry of suckling piglets in the early postnatal development. Folia Fac. Med., 66, 1989b, s. 60.
- KUDWEIS, M. — LOJDA, Z.: Diferenční proces pohárkových buněk sliznice tenkého střeva selat a syntéza hleny při experimentální enteritidě. In: JANOUŠEK, V. — ŠPÁLA, M.: Současné směry v patologické fyziologii. 1989c, s. 231—233.
- KUDWEIS, M. — JULIŠ, I. — LOJDA, Z. — VÍTOVEC, J. — KOUDELA, B.: Denzitometrická analýza aktivity aminopeptidázy M ve sliznici tenkého střeva selat experimentálně infikovaných kokcidii *Isoospora suis*. Veter. Med. (Praha), 35, 1990, s. 679—694.
- KUDWEIS, M. — LOJDA, Z. — KOUDELA, B. — VÍTOVEC, J.: Syntéza hleny pohárkových buněk tenkého střeva při experimentální infekci selat kokcidii *Isoospora suis*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989a, s. 727—734.
- KUDWEIS, M. — LOJDA, Z. — VÍTOVEC, J. — KOUDELA, B.: Aktivita vybraných dehydrogenáz a monoaminoxidáz v tenkém střevě gnotobiotických selat infikovaných kokcidii *Isoospora suis*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989b, s. 287—296.
- KUDWEIS, M. — LOJDA, Z. — VÍTOVEC, J. — KOUDELA, B. — ŠTĚRBA, J.: Poměr enterocytů a pohárkových buněk ve sliznici tenkého střeva při experimentální infekci selat kokcidii *Isoospora suis*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989c, s. 33—38.
- KUDWEIS, M. — VÍTOVEC, J. — KOUDELA, B.: Some histochemical findings on the intestinal mucosa of piglets during experimental infection with coccidia *Eimeria scabra*. Histochem. J., 19, 1987, s. 615—616.
- LOJDA, Z.: Histochemie enzymů. [Doktorská disertace.] Praha 1966a. 231 s. — Univerzita Karlova. Fakulta všeobecného lékařství.
- LOJDA, Z.: Histochemie disacharidáz a glukuronidáz. Commun. Czechoslov. Soc. Histochem. Cytochem., 1, 1966b, s. 64—71.
- LOJDA, Z.: Cytochemie lidské jejunální sliznice. [Habilitační práce.] Praha 1967. 138 s. — Univerzita Karlova. Fakulta všeobecného lékařství.
- LOJDA, Z.: Histochemie a elektronová mikroskopie tenkého střeva u malabsorpčního syndromu. In: FRIČ, P.: Malabsorpční syndrom. Praha, SZdN 1969, s. 108—115.
- LOJDA, Z.: Cytochemistry of enterocytes and of other cells in the mucous membrane of the small intestine. In: SMYTH, D. H.: Intestinal Absorption. London—New York, Plenum Press 1974, s. 43—122.
- LOJDA, Z.: Aktuelle Probleme der Cytochemie der Lysosomalen Hydrolasen. Acta morphol. Acad. Sci. hung., 20, 1975, s. 269—293.
- LOJDA, Z.: Patologie trávicího traktu. VII. Střevo. In: BEDNÁŘ, B.: Patologie, sv. II., Praha, Avicenum 1983a, s. 986—1032.
- LOJDA, Z.: Malabsorption. In: FILIPE, M. I. — LUKE, B. D.: Histochemistry in pathology. Churchill — Livingstone — Edinburgh — London — Melbourne — New York, 1983b, s. 136—144.
- LOJDA, Z. — FRIČ, P.: Histochemie glukosidáz a disacharidáz v perorálních biopsiích tenkého střeva. Českoslov. Patol., 3, 1967, s. 96—102.
- LOJDA, Z. — FRIČ, P. — JODL, J. — CHMELÍK, V.: Cytochemistry of the human jejunal mucosa in the norm and in malabsorption syndrom. Curr. Top. Path., 52, 1970, s. 1—63.
- LOJDA, Z. — GOSSRAU, R. — SCHIEBLER, T. H.: Enzyme histochemistry. A laboratory manual. Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag 1979a, s. 1—339.

- LOJDA, Z. — KOCIÁNOVÁ, J. — MAŘATKA, Z.: Histochemistry of the human duodenal mucosa with special reference to the gradient of the activities of the brush border enzymes. *Acta gastroenterol. scand.*, 21, 1979b, s. 75—91.
- LOJDA, Z. — PETRAŠKO, M. — HAVRÁNKOVÁ, E. — LOJDA, L.: Early postnatal development of the brush border enzymes of enterocytes in the rat and mini-pig. *Histochem. J.*, 16, 1984, s. 364—369.
- MEIJER, A. E. F. H. — VLOEDMAN, A. H. T.: Semipermeable membrane for improving the histochemical demonstration of enzyme activity in tissue sections. II. Non-specific esterase and β -glucuronidase. *Histochemie*, 34, 1973, s. 127—134.
- NARITA, M. — FUKUSHO, A. — SHIMIZU, Y.: Electron microscopy of the intestine of gnotobiotic piglets infected with porcine rotavirus. *J. Comp. Pathol.*, 92, 1982, s. 589—597.
- ROBERTS, E. D. P. — WALKER, E. J.: Field study of coccidial and rotaviral diarrhoea in unweaned piglets. *Veter. Rec.*, 110, 1982, s. 11—13.
- ROBINSON, Y. — MORIN, M. — GIRARD, C. — HIGGINS, R.: Experimental transmission of intestinal coccidiosis to piglets: clinical, parasitological and pathological findings. *Can. J. comp. Med.*, 47, 1983, s. 401—407.
- ROSS, A. D.: Small intestinal carcinoma in sheep. *Austral. Veter. J.*, 56, 1980, s. 25—28.
- RŮŽICKOVÁ, M. — LOJDA, Z. — MALIŠ, F.: Circadian rhythm of enzyme activities of the rat small intestine. *Acta Univ. Carol., Med. Monograph.*, 79, 1978, s. 89—97.
- SITKO, M.: Štúdium morfológických zmien pri paratýfe bažantov. [Kandidátská disertácia.] Košice, 1970. 147 s. — Vysoká škola veterinárská.
- TRIER, J. S. — RUBIN, C. E.: Electron microscopy of the small intestine: A review. *Gastroenterology*, 40, 1965, s. 574—603.
- VÍTOVEC, J. — KOUDELA, B.: Double alteration of small intestine in *Isospora suis* infection in conventional and gnotobiotic piglets. *Folia parasit.*, 37, 1990, s. 21—23.

Došlo dne 13. 11. 1989

KUDWEIS, M. — LOJDA, Z. — JULIŠ, I. (Research and diagnostical Histochemistry Laboratory of the Regional Hospital, Český Krumlov; Laboratory of Histochemistry affiliated to the Faculty of Medicine of Charles University, Praha): *Lysosomal activity of small intestine enterocytes in piglets experimentally infected by the coccidia Isospora suis*. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991 (1): 39—50.

The lysosomal activity of enterocytes of the small intestine mucosa was investigated in gnotobiotic and conventional piglets experimentally infected on the first day after birth (DAB) by the oocysts of the coccidia *Isospora suis*. A method of the proof of β -D-glucuronidase (EC.3.2.1.31.) activity was used to demonstrate lysosomes. The piglets were infected by different infection doses of oocysts (100 000 oocysts in gnotobiotic piglets and 200 000 oocysts in conventional piglets). In the gnotobiotic infected piglets the activity of β -D-glucuronidase in enterocyte lysosomes was investigated in the period from day 3 to day 11 after infection (DAI) and in the infected conventional piglets in the period from day 2 to day 10 after infection. Comparing the control piglets, the group of gnotobiotic piglets at the age of 2—5 days and the group of conventional piglets at the age of 4—7 days, the higher activity of β -D-glucuronidase was demonstrated in the lysosomes of intestinal mucosa enterocytes in the gnotobiotic control piglets ($+5.30$ of the average density value, $\bar{D}\bar{x}$). In the infected gnotobiotic and conventional piglets the pattern of β -D-glucuronidase activity was found to have three stages in the course of this infection. Two stages can be characterized by a great increase in the enzyme activity (DAI 3—9 in gnotobiotic piglets, DAI 2—3 and 7—9 in conventional piglets). The third stage, which is manifest mainly in the conventional infected piglets, is characterized by a marked decrease in the activity of β -D-glucuronidase, reaching the level of control findings (DAI 10 and mainly 11 in gnotobiotic piglets, DAI 4—6 and 10 in conventional piglets). A topographical picture shows that the two stages of increase and the stage of β -D-glucuronidase activity decrease occur in the whole small intestine without any predisposition defect of the enzyme in the different sections of the small intestine.

experimental infection; histochemistry; β -D-glucuronidase; lysosomes; *Isospora suis*

Adresy autorů:

MVDr. Miloš Kudweis, CSc., Výzkumná a diagnostická histochemická laboratoř, nemocnice, 381 27 Český Krumlov
 Prof. MUDr. Zdeněk Lojda, DrSc., člen koresp. ČSAV, MUDr. Ivan Juliš, Laboratoř pro histochemii, lékařská fakulta UK, Studničkova 2, 128 00 Praha 2

OVĚŘENÍ METODY A TESTACE ÚČINNOSTI ANTIFASCIOLIK PROTI JUVENILNÍM STADIÍM MOTOLICE *FASCIOLA HEPATICA* U LABORATORNÍCH MYŠÍ

K. Babíček, J. Daněk

BABÍČEK, K. — DANĚK, J. (Výzkumný ústav pro biofaktory a veterinární léčiva, Pohoří-Chotouň): *Ověření metody a testace účinnosti antifasciolik proti juvenilním stadiím motolice Fasciola hepatica u laboratorních myší*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (1): 51–56.

Letalita myší s rozdílnou počáteční hmotností při experimentální infekci 11–12 g, resp. 30–35 g byla sledována po infekčních dávkách 5, 7 a 10 adoleskarií. Po dávce pěti adoleskarií uhynulo 33,3 % resp. 58,3 % po dávce sedmi adoleskarií uhynulo 50 % resp. 66,7 % a po dávce 10 adoleskarií uhynulo 83,3 % resp. 91,7 procenta infikovaných myší. Téměř všechny úhyny byly zaznamenány v období od 23. do 35. dne po infekci (DPI). Účinnost substancí clorsulon, closantel, oxyklozanid, rafoxanid na juvenilní stadia motolice *F. hepatica* byla sledována u myší experimentálně infikovaných dávkou 10 adoleskarií. Substance byly aplikovány *per os* 13. a 14. DPI v dávkách od 50 mg do 400 mg $\cdot$ kg⁻¹ ž. h. a den. U clorsulon byla zaznamenána vyšší než 90% účinnost po aplikaci dávek 100 mg a 200 mg $\cdot$ kg⁻¹ ž. h. a po podání dávky 400 mg $\cdot$ kg⁻¹ ž. h. byla dosažena 100% účinnost. Účinnost 77,8 % byla zaznamenána u diamfenetidu po aplikaci dávky 200 mg $\cdot$ kg⁻¹ ž. h. a po dávce 400 mg $\cdot$ kg⁻¹ ž. h. činila účinnost 100 %. Substance closantel, rafoxanid a oxyklozanid neprokázaly standardní účinnost na juvenilní stadia motolice *F. hepatica*. U vyléčených myší byla jaterní tkáň v době ukončení testací, tj. 22. DPI regenerována. Laboratorní model *F. hepatica* u myší lze při popsání metodice využívat pro screening látek.

screening; myš; *Fasciola hepatica*; juvenilní stadia; odstupňované dávky adoleskarií; letalita

Při farmakologickém vyhledávacím výzkumu potenciálních látek s antitrematodickým účinkem je nejčastěji využíván model *Fasciola hepatica* u laboratorních potkanů (Lämmler, 1959; Thorpe, 1965a, b; Chroustová a Willomitzer, 1968; Boray, 1969; Babíček a Daněk, 1989a).

Použití laboratorních myší pro testace účinku antifasciolik na adultní formy motolice je limitováno vysokou letalitou experimentálně infikovaných zvířat v závěru akutní fáze fasciolózy již po infekčních dávkách jedné až dvou adoleskarií (Dawes, 1962; Lang, 1966). Masaba (1981) popisuje od 21. dne po infekci (DPI) klinické změny zdravotního stavu a od 29. DPI úhyny experimentálně infikovaných myší po infekční dávce dvou adoleskarií. Dawes (1962) zaznamenal výrazný hemoragický exsudát v břišní dutině od 24. DPI dávkou pěti adoleskarií na myš. Babíček a Daněk (1989b) popisují 25% letalitu po

infekční dávce tři adolescenti na myš, po dávce pěti až sedmi adolescenti uhynulo 58 % zvířat a po dávkách 10 a 15 adolescenti uhynula všechna zvířata. Úhyny byly zaznamenány v akutní fázi fasciolózy od 24. do 31. DPI.

Andrews [1979] před 21. DPI zaznamenal pouze ojedinělý úhyn po dávce čtyř adolescenti ve skupině 25 myší a ve skupině 15 myší nezaznamenal žádný úhyn po infekční dávce osmi adolescenti na myš.

O metodách testace účinku antifasciolik a o jejich účinnosti na juvenilní formy motolic *F. hepatica* u laboratorních myší jsme nacházeli pouze ojedinělé údaje. Boray [1969] cituje nepublikovanou pozorování Hapich, který aplikoval dvakrát po sobě nitroxylin, hexachlorofen, Hilomid a Hetol experimentálně invadovaným myším dávkou 10 adolescenti. Aplikace byla prováděna třetí týden po infekci a za sedm dnů po léčbě byla zvířata utracena. Autor popisuje úhyny myší po obvykle tolerovaných dávkách a nedoporučuje používání myší pro testace.

Coles [1976] zjistil sníženou aktivitu jaterního parenchymu u myší při uvolňování účinných metabolitů diamfenetidu. Andrews [1979] testoval vliv antifasciolik na juvenilní stadia *F. hepatica* u myší. Potvrdil účinnost rafoxanidu a nižší účinnost diamfenetidu, oxyklozanid nebyl účinný. Použité dávky však neuvádí. Autor doporučuje provádět screening účinných látek proti juvenilním i adultním motolicím *F. hepatica* u myší za určitých omezení.

Cílem naší práce bylo prověření možnosti testace účinku vybraných antifasciolik rafoxanidu, clorsulon, closantelu, oxyklozanidu a diamfenetidu na juvenilní stadia motolice *F. hepatica* u experimentálně infikovaných laboratorních myší. Na základě získaných výsledků posoudit vhodnost metody pro screening látek neznámé aktivity.

MATERIÁL A METODY

Detailní metodiky odchovu meziphostitských plůž *Lymnaea tomentosa*, získávání a ošetřování adolescenti včetně výchozích literárních citací byly publikovány autory Babíček a Daněk [1989a].

Infekční dávku adolescenti v pokusech 1 a 2 jsme aplikovali pomocí jícnové sondy perorálně. Ve všech pokusech jsme používali samce laboratorních myší kmene CRI [Velaz], kteří byli krmení kompletní krmnou směsí DOS 2B a napájeni vodou *ad libitum*.

V pokuse 1 jsme sledovali letalitu myší po infekčních dávkách 5, 7 a 10 adolescenti *pro toto* ve dvou souběžných skupinách. Do první skupiny jsme zařadili myši o počáteční hmotnosti 11–12 g a do druhé skupiny o počáteční hmotnosti 30–35 g. V každé pokusné skupině i v příslušných neinfikovaných kontrolních skupinách bylo 12 myší.

Pokusy jsme ukončili 56. DPI. Na základě helmintologické pitvy jater jsme stanovili intenzitu a extenzitu infekce (II, EI) u přeživajících laboratorních myší.

Na základě získaných výsledků z pokusu 1 jsme ověřovali v pokuse 2 účinnost vybraných substancí známých antifasciolik na juvenilní stadia *F. hepatica* u myší s počáteční hmotností 11–12 g. Myši ve všech pokusných skupinách jsme nultý den pokusu infikovali dávkou 10 adolescenti. Do každé léčené skupiny jsme zařadili šest zvířat a do neléčené kontrolní skupiny 12 laboratorních myší. Účinné substance clorsulon (MSD AGVET), rafoxanidu (MSD AGVET), closantelu (Janssen Pharmaceutic), oxyklozanidu (COOPERS) a diamfenetidu (VCHZ Synthesia) jsme aplikovali suspendované v Dorfmanově činidle 13. a 14. DPI. Použité dávky jednotlivých účinných substancí uvádíme v tab. II. Pokus jsme ukončili 22. DPI a játra všech pokusných zvířat jsme mikroskopicky vyšetřili kompresní metodou. Na základě výsledků helmintologické orgánové pitvy jater jsme stanovili účinnost metodou nepřímé aktivity, kterou publikoval Steward [1955].

VÝSLEDKY

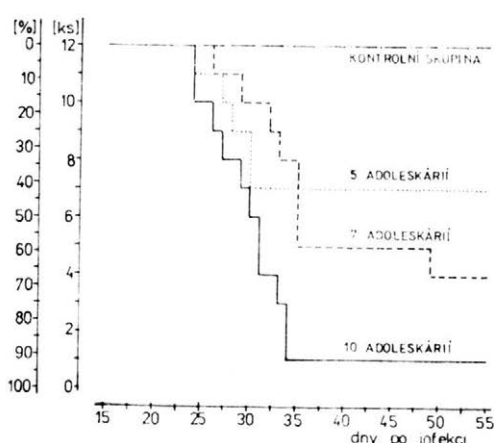
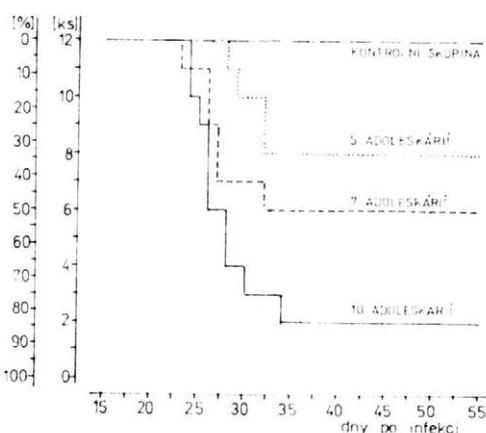
Letalitu myší v pokuse 1 s počáteční hmotností 11–12 g uvádíme na obr. 1 a úhyny myší s počáteční hmotností 30–35 g jsou zaznamenány na obr. 2.

Nález motolic na základě helmintologické pitvy jater a dosažená intenzita a extenzita infekce u obou skupin je uvedena v tab. I. U uhynulých infikovaných myší jsme při patologickoanatomickém vyšetření zjišťovali rozsáhlé nekrózy jaterního parenchymu, hematomy v játrech, ascites a fibrinózní peritonitidy. U utracených zvířat 56. den pokusu jsme nacházeli pohlavně zralé motolice *F. hepatica*, které byly lokalizovány v dilatovaných žlučovodech. U kontrolních zvířat bylo patologickoanatomické i helmintologické vyšetření negativní.

Výsledky účinnosti testovaných antifasciolik v pokuse 2 uvádíme v tabulce II.

Při mikroskopickém vyšetřování jaterního parenchymu kompresní metodou jsme 22. den po infekci, tj. osmý den po poslední aplikaci antifasciolik nacházeli výhradně živé a neporušené motolice *F. hepatica*. U vyléčených myší jsme nacházeli bělavá nekrotická ložiska s amorfním obsahem o průměru 1–2 mm, okolní jaterní tkáň byla převážně regenerována.

U kontrolních neléčených a u nevyléčených pokusných myší jsme nacházeli ascites, fibrinózní peritonitidy, rozsáhlé nekrózy a hematomy v jaterní tkáni.



ks — number of mice, kontrolní skupina — control group, adoleskarií — metacercariae, dny po infekci — days after infection

1. Úhyny myší po rozdílných infekčních dávkách *F. hepatica* (hmotnost při infekci 11–12 g) — Mortality of mice after administration of different infection doses of *E. hepatica* (body weight at the time of infection 11–12 g)

2. Úhyny myší po rozdílných infekčních dávkách *F. hepatica* (hmotnost při infekci 30–35 g) — Mortality of mice after administration of different infection doses of *F. hepatica* (body weight at the time of infection 30–35 g)

I. Výsledky helmintologické pitvy jater a břišní dutiny po odstupňovaných dávkách adoleškarií v pokuse 1 — The results of a helminthological dissection of liver and organs in the abdominal cavity after administration of gradated doses of metacercariae in Trial 1

Počáteční hmotnost myši ¹ [g]	Infekční dávka adoleškarií ²	Průměrný nález motolic ($\bar{x}$) ³			Záchytnost ⁴ [%]	EI [%]	Úhyn celkem ⁶ [%]
		u uhynulých myší ⁴	u přeživších myší ⁵	celkem ⁶			
11—12	0	0,0	0,0	0,0	—	—	0,0
	5	2,5	2,25	2,33	46,6	100,0	33,3
	7	2,83	2,5	2,67	38,1	100,0	50,0
	10	4,1	4,0	4,08	40,8	100,0	83,3
30—35	0	0,0	0,0	0,0	—	—	0,0
	5	2,14	0,8	1,58	31,6	91,67	58,3
	7	3,13	2,5	2,92	41,7	100,0	66,7
	10	3,9	3,0	3,83	38,3	100,0	91,7

¹starting weight of mice, ²infection dose of metacercariae, ³average number of liver flukes, ⁴mortality of mice, ⁵surviving mice, ⁶total number of liver flukes, ⁷catch rate, ⁸total

II. Účinnost standardních antifasciolik na juvenilní motolice *Fasciola hepatica* u experimentálně infikovaných myší — The efficacy of standard antifasciolics in the control of juvenile liver flukes *Fasciola hepatica* in experimentally infected mice

Skupina ¹ Účinná látka ²	Denní dávka ³ mg · kg ⁻¹ ž. h.]	Počet myší ⁴	Úhyn myší ⁵	Celkem motolic ⁶ [$\bar{x}$]	Účinnost ⁷ [%]
Kontrolní neléčená ⁸	—	12	0	4,50	—
Clorsulon	50	6	1	1,60	64,4
	100	6	0	0,33	92,6
	200	6	0	0,17	96,2
	400	6	0	0,00	100,0
Rafoxanid	50	6	0	4,33	3,8
	100	6	0	2,67	40,6
	200	6	0	4,5	0,0
	400	6	0	3,16	29,8
Diamfenetid	100	6	0	3,16	29,8
	200	6	2	1,00	77,8
	400	6	0	0,00	100,0
Closantel	100	6	0	2,83	37,1
	200	6	0	2,83	37,1
	400	6	0	2,17	51,7
Oxyklozanid	200	6	0	2,67	40,6
	400	6	2	4,75	0,0

¹group, ²active substance, ³daily dose, ⁴number of mice, ⁵mortality of mice, ⁶total number of liver flukes, ⁷efficacy, ⁸control — untreated

DISKUSE

Většinu úhynů experimentálně infikovaných laboratorních myší v pokuse 1 jsme zaznamenali v období od 23. do 35. DPI nezávisle na hmotnosti myší a velikosti námi použitých infekčních dávek. Andrews (1979) obdobně zaznamenával ojedinělé úhyny infikovaných myší moto-

licemi *F. hepatica* do 21. DPI, nejvyšší úhyny pozoroval téměř shodně s našimi výsledky od 21. do 31. DPI. Rozdílně však zaznamenával poměrně vysoké úhyny myší v chronické fázi fasciolózy. Podle našich, doposud nepublikovaných pozorování, jsou motolice *F. hepatica* od 35. DPI výhradně lokalizovány v dilatovaných žlučovodech. Jaterní parenchym není nadále rozrušován migrací helmintů a nastává jeho rychlá regenerace, což vede k výraznému snížení úhynů experimentálně infikovaných myší. Nepotvrdili jsme doporučení, které uveřejnil Andrews (1979), v němž udává nejzazší termín pro ukončení testací 28. DPI. Na základě výsledků vlastních pozorování doporučujeme ukončit testace účinku antifasciolik na juvenilní formy motolic u myší 22. DPI, protože v následujících dnech nastávají výrazné změny klinického stavu a dochází k úhynům zvířat.

U uhynulých myší jsme při patologickoanatomické pitvě nacházeli ascites, fibrinózní peritonitidy, nekrózy a hematomy v jaterním parenchymu shodně s údaji, které publikoval Dawes (1962). Dále jsme zjistili, že od 24. dne po infekci je hodnota kompresního vyšetření omezena zvyšující se indurací a kalcifikací jaterní tkáně a žlučovodů.

Na základě těchto výsledků jsme upravili metodický postup při uskutečnění pokusu 2, ve kterém byla hodnocena účinnost vybraných standardních antifasciolik.

Účinná substance diamfenetid prokázala 100% účinnost až po dvakrát opakované aplikaci vysoké dávky $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ živé hmotnosti. Pro srovnání např. Elizian a Tamiji (1977) a Bajagin a Demidov (1980) popisují 100% účinnost na juvenilní motolice *F. hepatica* ve věku méně než pět týdnů u ovcí již po dávce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ hmotnosti. Nepřímo tím potvrzujeme závěry Coles (1976), který prokazuje sníženou tvorbu dezacetylací uvolňovaných účinných metabolitů diamfenetidu v jaterním parenchymu myší.

Substance clorsulon dosahovala vysokou účinnost v dávkách 100, 200 a $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ živé hmotnosti. Literární citace o účinnosti námi použitých dávek clorsulonů na vývojová stadia u laboratorních myší jsme v dostupné literatuře nezaznamenali. Mrozík aj. (1977) popisují po jednorázové dávce $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. ovcí vyšší účinnost než 90 % na motolice ve věku pěti týdnů po infekci. Po dávce $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. h. nepozoroval u ovcí vedlejší klinické příznaky.

U substancí oxyklozanidu, rafoxanidu a closantelu jsme nezaznamenali standardní vysoký účinek na juvenilní stadia motolic u experimentálně infikovaných laboratorních myší.

Pro objektivní hodnocení účinnosti testovaných látek je důležitý časový interval osm dnů od poslední aplikace látek do ukončení pokusu, tj. provedení helmintologické pitvy jater a žlučovodů. V tomto termínu již nedochází při diagnostice k záměně mezi uhynulými a přežívajícími motolicemi.

Laboratorní model *F. hepatica* u myší lze využít pro vyhledávání potenciálních antitreumatodik s účinností na juvenilní stadia motolic při screeningu látek.

Literatura

- ANDREWS, P.: The mouse as experimental host for *Fasciola hepatica*. *Helmintologia*, 16, 1979, s. 207–215.
BABÍČEK, K. — DANĚK, J.: Ověření metody testace antifasciolik na modelovém hel-

mintu *Fasciola hepatica* u experimentálně invadovaných laboratorních potkanů. Biol. Chem. Veter. (Praha), 25, 1989a, s. 311–320.

BABIČEK, K. — DANĚK, J.: Využití laboratorních hlodavců a ježnat pro experimentální invaze motolicí *Fasciola hepatica*. Zpr. Českoslov. parazit. Společ. 1989b, (v tisku).

BAJAGIN, V. N. — DEMIDOV, N. V.: Efektivnost diamfenetida při fascioleze ovcí i krupno-rogového skotu. Bjull. Vsesojuz. Inst. Gelmint. Skrjabina, 1980, s. 13–14.

BORAY, J. C.: Experimental fascioliasis in Australia. Adv. Parasitol., 7, 1969, s. 95–210.

COLES, G. C.: The inactivity of diamphenetide against liver fluke in certain species of mammals. Res. Veter. Sci., 20, 1976, č. 1, s. 110–111.

DAWES, B.: On the growth and maturation of *Fasciola hepatica* L. in the mouse. J. Helminth., 36, 1962, s. 11–38.

ELIAZIAN, M. — TAMIMI, Y.: The efficiency of diamphenetide against *Fasciola hepatica* in sheep. Brit. veter. J., 133, 1977, s. 458–460.

CHROUSTOVÁ, E. — WILLOMITZER, J.: Methods adopted in investigation of medications against fasciolosis by using artificial invasions. Acta Univ. agric. (Brno), Řada B, 37, 1968, s. 453–462.

LANG, B. Z.: Host-parasite relationship of *Fasciola hepatica* in the white mouse. I. Response to primary infection. J. Eliska Mischell. Sci. Soc., 82, 1966, s. 195–203.

LÄMMLER, G.: Die Chemotherapie der Fasciole. III. Mitteilung. Über die experimentelle *Fasciola hepatica* — Infektion der Albinoratte. Z. Tropenmed. Parasit., 10, 1959, s. 379–384.

MASABA, N. E.: *Fasciola hepatica* infection in mice. Ann. Trop. med. Parasit., 75, 1981, s. 185–195.

MROZIK, H. — RAHWAY, N. J. — KALAMAZOO, M.: 4-amino-6-(trichloroethenyl)-1,3-benzenedisulfonamide, a new potent fasciolicide. J. med. Chem., 20, 1977, s. 1225–1227.

STEWART, J. S.: Anthelmintic studies. I. A controlled critical enteronemacidal test. Parasitology, 45, 1955, s. 231–241.

THORPE, E.: The pathology of experimental fascioliasis in the albino rat. J. comp. Path., 75, 1965a, s. 39–44.

THORPE, E.: Chemotherapy of experimental fasciolosis in the albino rat. J. Comp. Path., 75, 1965b, s. 45–53.

Došlo dne 10. 2. 1990

BABIČEK, K. — DANĚK, J. (Research Institute of Feed Supplements and Veterinary Products, Pohoří-Chotouň): *Verification of the method and tests of the efficacy of antifasciolics in the control of juvenile stages of the liver fluke Fasciola hepatica in laboratory mice.* Veter. Med., (Praha), 36, 1991: 51–56.

Lethality of mice experimentally infected by the metacercariae of *F. hepatica* was determined. Starting body weights of mice were 11–12 g and 30–35 g respectively; infection doses were 5, 7 or 10 metacercariae respectively. After the dose of five metacercariae 33.3 %, or 58.3 % of infected mice died; respective percentages after administration of the doses of seven and ten metacercariae were 50 %, or 66.7 %, and 83.3 %, or 91.7 %. Almost all losses were recorded in the period from day 23 to day 35 after infection (DAI). The efficacy of the substances closulon, closantel, oxyclozanid, rafoxanid was investigated in the control of juvenile stages of the liver fluke *F. hepatica* in mice infected by the dose of ten metacercariae. The substances were administered per os on DAI 13 and 14 at the doses from 50 mg to 400 mg per kg live weight/day. The efficacy of closulon was higher than 90 % after administration of the doses 100 mg and 200 mg per kg live weight, 100% efficacy being reached after administration of the dose 400 mg per kg liveweight. The efficacy of diamfenetid doses 200 mg per kg live weight and 400 mg per kg live weight reached 77.8 % and 100 %, respectively. The products closantel, rafoxanid and oxyclozanid did not show standard efficacy in the control of juvenile stages of the liver fluke *F. hepatica*. The liver tissue of cured mice was found to be regenerated at the end of the tests, i. e. on DAI 22. The laboratory model of *F. hepatica* in mice can be used for substance screening applying the described method.

screening; mouse; *Fasciola hepatica*; juvenile stages; graduated doses of metacercariae; lethality

Adresa autorů:

MVDr. Karel Babíček, MVDr. Jaroslav Daněk, CSc., Výzkumný ústav pro bio-faktory a veterinární léčiva, Pohoří-Chotouň, 254 49 Jílové u Prahy

BOTULISMUS PTACTVA NA VODNÍM DÍLE NOVÉ MLÝNY (OKRES BŘECLAV)

Z. Hubálek, J. Pellantová, K. Hudec, J. Halouzka, J. Chytil, P. Macháček,
M. Šebela, F. Kubíček

HUBÁLEK, Z. — PELLANTOVÁ, J. — HUDEC, K. — HALOUZKA, J. — CHYTIL, J. — MACHÁČEK, P. — ŠEBELA, M. — KUBÍČEK, F.: {Ústav systematické a ekologické biologie ČSAV, Brno; Správa CHKO a BR Pálava, Mikulov; Regionální muzeum, Mikulov; Moravské muzeum, Brno; Přírodovědecká fakulta UJEP, Brno}: *Botulismus ptactva na vodním díle Nové Mlýny (okres Břeclav)*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (1): 57—63.

Na rozsáhlých mělkých údolních nádržích vodního díla Nové Mlýny proběhla od května do října 1988 a následně od února do počátku dubna 1989 velká epizootie volně žijícího vodního ptactva, způsobená toxinem *Clostridium botulinum* typ C. Celkem bylo zaznamenáno více než 3000 mrtvých či hynoucích ptáků 44 druhů, s převahou řádů *Anseriformes* (56 %), *Lariiformes* (33 %), *Charadriiformes* (6 procent) a *Ralliformes* (4 %). Botulotoxin byl detekován ve vysoké koncentraci v sarkofágních muších larvách *Calliphora vomitoria* a *Lucilia sericata*, sbíraných z ptačích kadaverů, nebyl však prokázán v různých složkách vodního prostředí (voda, submerzní vegetace, fytoplankton, zooplankton, *Gastropoda*, *Crustacea*, *Oligochaeta*, larvy *Odonata*, *Chironomidae* a *Ceratopogonidae*). Další vývoj epizootické situace na vodním díle Nové Mlýny bude závislý na stavu vodní hladiny a meteorologických podmínkách v kritickém období (květen až září).

vodní ptáci; botulismus; *Clostridium botulinum* typ C; sarkofágní mouchy

Vodní dílo Nové Mlýny (VDNM) je budováno postupně od roku 1975 v údolní nivě řeky Dyje a jejího přítoku Svatky. Je tvořeno třemi zdržemi, z nichž horní (528 ha) byla dokončena a definitivně napuštěna v roce 1979, střední (1031 ha) 1987 a dolní (1668 ha) 1989. Voda v nádržích je mělká, průměrná hloubka jednotlivých zdrží je 2,2 (horní), 3,4 (střední) a 5,2 m (dolní). a voda je charakterizována značným znečištěním organickými a anorganickými látkami (fosfáty, nitráty, amonné ionty), silným kolísáním koncentrace rozpuštěného kyslíku, mírnou alkalinitou (pH 7,0—9,2) a velkým přísunem suspendovaných nerozpuštěných látek (Heteša a Marvan, 1984; Kočková a Pellantová, 1988). VDNM je situováno v klimaticky suché a teplé oblasti: průměrná roční teplota vzduchu je 9 °C, lednová —2 °C a červencová 20 °C (průměr maximálních denních teplot v červenci 26 °C); průměrná délka vegetačního období (průměrné denní teploty 10 °C a více) 175—180 dní; průměrný roční úhrn srážek 495—550 mm (Vesecký aj., 1961; Demek a Macka, 1970).

Vysoký stupeň eutrofizace vody VDNM je spojen s řadou nežádoucích průvodních jevů, mj. s intenzivním růstem anaerobních mikroorganismů a produkcí jejich toxinů. Největší dopad má toxinogeneze u *Clostridium botulinum* typu C, která se projevuje sporadickým až masovým hynutím vodního ptactva na nádržích. I když se v zájmové oblasti botulismus ptáků občas vyskytoval, pravděpodobně i před napuštěním nádrží v letech 1967–1983 — podle klinických příznaků u nemocných vodních ptáků na lokalitách Pansee (Strachotín) a Šakvický rybník (Hudec aj., 1984; Hudec a Pellantová, 1985), a *C. botulinum* typu C bylo izolováno v roce 1983 z bahna na lokalitě Pansee (Neubauer aj., 1988), k velkým epizootiím botulismu došlo až po zaplavení území. Neubauer aj. (1988) dokázali přítomnost původce otravy na horní i střední zdrži VDNM v bahně a na vodních řasách.

Zvláště rozsáhlá epizootie botulismu byla pozorována na střední a spodní zdrži VDNM od května do října 1988, s pokračováním ještě v předjaří a na jaře 1989. Rozsah hynutí zneklidnil nejen konzervátory přírody, ale i širokou veřejnost na okrese Břeclav, poněvadž uhynulo nejméně 65 labutí (*Cygnus olor*) a více než 1000 divokých kachen (převážně *Anas platyrhynchos* a *A. crecca*). Uhynuli i vzácní morčáci *Mergus albellus*, kolpík *Platalea leucorodia*, řácci *Larus minutus* a bahňáci *Calidris minima*, *C. temminckii*, *Limosa limosa* (Chytil, 1988, 1989a, b).

V této práci referujeme o počtech uhynulých ptáků a o výsledcích laboratorního vyšetření nemocných jedinců i některých dalších složek vodního ekosystému na přítomnost botulotoxinu.

MATERIÁL A METODY

Sledování uhynulých ptáků bylo uskutečněno na větší části střední a dolní zdrže VDNM v měsících květen až říjen 1988, podrobné sčítání pak v období největšího rozmachu epizootie 4. 8., 8. 8., 17. 8., 19. 8., 22. 8., 23. 8., 26.–27. 8., 29.–30. 8., 8. 9., 2. 10. a 30. 10. — převážně jen na střední zdrži a v oblasti Šakvického rybníka na dolní zdrži. V předjaří a na jaře 1989 byla provedena kontrola na spodní zdrži VDNM v oblasti Šakvického rybníka a Pansee ve dnech 8. 2., 2. 3., 3. 3., 10. 3. a 6. 4.

Nemocným ptákům na dolní zdrži VDNM v prostoru Šakvického rybníka byly odebrány vzorky krve k laboratornímu vyšetření 11. října 1988 (2 labutě velké, *Cygnus olor* — B 44, B 45) a 3.–10. března 1989 (7 poláků chocholaček, *Aythya fuligula* — B 73 až B 79). V den odběru byla separovaná krevní séra zmrazena (–20°C) až do vyšetření, které bylo uskutečněno intraperitoneální inokulací po 0,5 ml nativního séra vždy dvěma adultním SPF myším. Pokud zvířata uhynula do 3–5 dnů po inokulaci, byl proveden s daným vzorkem séra toxin-neutralizační test (TNT) s botulinickými antiséry typů A až E a tepelná zkouška obdobně jako v naší předešlé práci (Hubálek aj., 1984). Toxin byl titrován intraperitoneální inokulací myši po 0,5 ml vzorků ředěných geometrickou řadou s koeficientem 4 nebo 10 a titr vyjádřen v LD₅₀. ml⁻¹.

11. října 1988 bylo poblíž ptačích kadaverů odebrány k toxikologickému vyšetření další vzorky z oblasti dolní zdrže VDNM (lokalita Šakvický rybník): zelené řasy (vzorek B 33), submerzní stonky rákosu *Phragmites communis* (B 34), voda o pH 8,3 (B 35), zooplankton (B 36, B 37), 400 červů *Oligochaeta* (B 38, B 39), 12 larev *Ceratopogonidae* (B 40), 17 larev *Chironomidae* (B 41), 1 plovatka *Lymnaea stagnalis* (B 42) a několik desítek larev much *Calliphora vomitoria* a *Lucilia sericata* (det. Prof. Dr. D. Povolný, VŠZ Brno) z kadaverů labutí a kachen (B 46 až B 49). V době odběru vzorků (v říjnu 1988) nebyla ještě dokončena výstavba hrází dolní nádrže VDNM, nádrž nebyla napuštěna a na její ploše se nacházely tůně, mokřiny a drobné vodní plochy ve sníženinách. Šakvický rybník byl dosud oddělen hrází.

6. března 1989 byly na střední a dolní zdrži VDNM odebrány a vyšetřeny vzorky: 27 levatek *Physa acuta* (B 80, B 83), 11 plovatek *Lymnaea stagnalis* (B 81), 24 uchaetek *Radix peregra* (B 82), trus plžů *Gastropoda* (B 101, 102), jedna pijavice *Glossiphonia complanata* (B 84), 42 berušek *Asellus aquaticus* (B 85), 13 blešivců *Gammarus roeselii* (B 86), šest larev *Odonata* (B 87, B 89), 508 nitěnek *Tubifex tubifex* (B 88,

B 92, B 94, B 95, B 100], 33 nitěnek *Limnodrilus hofmeisteri* [B 96], 59 larev čeledi *Chironomidae* — *Chironomus* gr. *plumosus*, *Limnochironomus* gr. *nervosus*, *Procladius* sp. [B 90, B 93, B 97 až B 99] a jedna larva *Ceratopogonidae* [B 91]. Vzorky na střední nádrži byly odebrány v místech masového úhynu ptáků — pod soutokem Svatky a Jihlavy. V mělké vodě kolem ostrůvků, pod kameny a na naplaveném dříví byli bráni všichni bezohradní živočichové, kteří by mohli sloužit v této časné jarní době jako potrava vodních ptáků a zároveň být i nositeli botulotoxinu. K odebrání vzorků ve větší hloubce bylo použito dredže. Na dolní nádrži byly odebrány vzorky z prostoru Šakvického rybníka jednak z vodního sloupce a jednak z hloubky 2–3 m pomocí dredže. V této době již byla plocha tohoto bývalého rybníka součástí celé nádrže, bez patrných hrází.

Toxikologické vyšetření těchto neaviárních vzorků bylo uskutečněno po jejich homogenizaci ve vychlazených třecích miskách v menším objemu fyziologického roztoku s gentamicinem (200 µg·ml⁻¹), eluci (60 min při teplotě 20 °C ve tmě) a centrifugaci; supernatanty byly očkovány myším intraperitoneálně po 0,4 ml. Další vyšetření bylo provedeno obdobně jako se vzorky sér nemocných ptáků.

VÝSLEDKY

MORTALITA PTACTVA

V období květen—červen 1988 bylo registrováno přibližně 500 uhynulých kachen *Anas platyrhynchos* a 100 čírek *Anas crecca*. Nejvyšší frekvence úhynů byla zjištěna od konce července do října 1988, kdy bylo zaznamenáno v oblasti střední a dolní zdrže VDNM přibližně 1000 mrtvých racků *Larus ridibundus* a 1413 dalších ptáků 42 druhů (Chytil, 1989b):

5 *Podiceps nigricollis**, 2 *Phalacrocorax carbo**, 1 *Platalea leucorodia*, 68 *Cygnus olor**, 1 *Anser anser**, 667 *Anas platyrhynchos**, 17 *A. strepera**, 3 *A. penelope*, 240 *A. crecca*, 20 *A. querquedula**, 15 *A. clypeata**, 2 *Netta rufina**, 12 *Aythya ferina**, 23 *A. fuligula**, 1 *Mergus albellus*, 120 *Fulica atra**, 1 *Gallinula chloropus**, 92 *Vanellus vanellus**, 4 *Charadrius dubius**, 2 *C. hiaticula*, 3 *Gallinago gallinago**, 1 *Numenius arquata*, 1 *Limosa limosa**, 4 *Tringa erythropus*, 27 *T. glareola*, 2 *T. ochropus*, 1 *T. totanus**, 1 *T. nebularia*, 25 *Actitis hypoleucos*, 3 *Calidris alpina*, 3 *C. minuta*, 2 *C. temminckii*, 2 *C. ferruginea*, 18 *Philomachus pugnax*, 1 *Larus argentatus*, 1 *L. canus**, 2 *L. minutus*, 2 *Sterna hirundo**, 6 *Motacilla alba**, 4 *Sturnus vulgaris*, 1 *Pica pica* a 7 *Corvus monedula*. Hvězdičkou jsou označeny druhy na VDNM hnízdící; ne všichni nalezení jedinci však museli na nádržích hnízdit — mohli protahovat. Pro další druhy je nádrž evropsky významnou tahovou zastávkou.

Od počátku února do počátku dubna 1989 pokračovalo hynutí v menší intenzitě, převážně u potápivých kachen. Bylo registrováno 47 mrtvých nebo nemocných *Aythya fuligula**, 1 *A. ferina**, 12 *Bucephala clangula*, 3 *Anas platyrhynchos**, 1 *Cygnus olor**, 3 *Fulica atra**, 1 *Phalacrocorax carbo**, 2 *Larus ridibundus*.*

Další nemocní ptáci byli pozorováni na VDNM 14. a 28. července a 3. srpna 1989: přibližně 137 *Anas platyrhynchos*, 16 *A. strepera*, 2 *A. clypeata*, 2 *A. querquedula*, 1 *A. crecca*, 7 *Aythya fuligula*, 1 *Netta rufina*, 26 *Fulica atra*, 1 *Gallinula chloropus*, 1 *Ardea cinerea*, 150 *Larus ridibundus*, 2 *Chlidonias nigra*, 3 *Philomachus pugnax*, 1 *Tringa totanus*, 2 *T. glareola*, 1 *Gallinago gallinago*, 4 *Actitis hypoleucos*, 1 *Calidris alpina* aj. Toto hynutí se přerušilo po zvýšení hladiny ve střední zdrži VDNM počátkem srpna.

Prakticky u všech hynoucích ptáků byly pozorovány symptomy slavitelné s klinickým obrazem botulismu: parézy až paralýzy svalstva (křidel, krku, nohou), ztížené dýchání, apatie.

PRŮKAZ BOTULOTOXINU U PTÁKŮ

V krevním séru obou nemocných labutí z 11. října 1988 byl prokázán toxin *C. botulinum* typu C v koncentraci 2 (B 44: ♂ ad.) a 6 (B 45: ♀ juv.) LD₅₀ . ml⁻¹. Rovněž v sérech všech sedmi vyšetřených nemocných poláků chocholaček (B 73 až B 79) z 3. až 10. března 1989 byl detegován botulotoxin C, v koncentracích 2,5 až 8 LD₅₀ . ml⁻¹. Všichni vyšetření ptáci (labutě i kachny) byli v dobrém výživném stavu (např. hmotnost šesti samců chocholaček byla 510—700 g, a jediná samice byla mírně kachektická — 460 g), u některých byl pozorován silný průjem zelenožluté barvy. Dále byly zjištěny parézy křídelného a krčního svalstva.

TOXIKOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ OSTATNÍCH VZORKŮ

Všechny vzorky neaviárního materiálu z října 1988 i března 1989 byly negativní, s výjimkou čtyř vyšetřených vzorků (B 46 až B 49) sarkofágních larev dipter druhů *Calliphora vomitoria* (L.) a *Lucilia sericata* (Meig.), sbíraných 11. října 1988 z kadaverů labutí a kachen na dolní zdrži VDNM. V těchto larvách byly prokázány vysoké koncentrace toxinu *C. botulinum* typu C, a sice 2500 LD₅₀ . g⁻¹ (B 46, B 48), 8000 LD₅₀ . g⁻¹ (B 49) a 80 000 LD₅₀ . g⁻¹ (B 47).

DISKUSE

V období květen až říjen 1988 bylo registrováno v oblasti střední a dolní zdrže VDNM celkem 3013 mrtvých nebo moribundních ptáků 43 druhů a v únoru až dubnu 1989 celkem 70 mrtvých nebo nemocných ptáků osmi druhů. Epizootie 1988/89 tedy zasáhla nejméně 3073 ptáků 44 druhů, s převahou řádů úzce vázaných na vodní prostředí: *Anseriformes* (56,4 % obětí), *Lariformes* (32,8 %), *Charadriiformes* (6,2 %), *Ralliformes* (4,0 procenta). Jen výjimečně (0,6 % obětí) byli postiženi např. terestričtí pěvci (*Motacilla alba*, *Sturnus vulgaris*, *Pica pica*, *Corvus monedula*), a to pravděpodobně v důsledku sběru intoxikovaných mušic larev z kadaverů. Je samozřejmé, že zde uváděné součty postižených ptáků reprezentují jen část (odhadem nanejvýš polovinu) veškerých skutečně uhynulých ptáků, poněvadž podchycení absolutního počtu obětí (např. skrytých v pobřežní vegetaci anebo odplavených na hladinu) není možné; navíc nebyly prohlíženy břehy všech zdrží po celé délce.

V krevním séru všech vyšetřovaných nemocných labutí a kachen jsme prokázali toxin *C. botulinum* typu C. Rovněž na SVÚ Brno (MVDr. Z. Kožušník, MVDr. Kovařík) prokázali botulotoxin v séru čtyř vyšetřovaných labutí velkých z října 1988 na VDNM a bakteriologickým vyšetřením nezjistili přítomnost žádných specifických patogenů v játrech a střevním traktu u čtyř vyšetřených labutí, jedné kachny divoké a jedné lysky z téže lokality; patologicko-anatomické vyšetření (MVDr. Lojda) ukázalo jen katarální enteritidu u většiny těchto ptáků, ostatní nálezy byly nevýrazné. Na základě klinických příznaků, pozorovaných prakticky u všech hynoucích ptáků během epizootie, a laboratorního průkazu botulotoxinu

typu C v krvi všech vyšetřených ptáků, lze vyslovit závěr, že pozorovaná epizootie byla intoxikací ptáků bakteriálním jedem *C. botulinum* typu C, který byl příčinou úhynu buď všech, nebo téměř všech jedinců. U ichthyofágního druhu *Phalacrocorax carbo* však není vyloučen toxin typu E, jak je známo z literatury. Uhynulí jedinci nebyli v tomto směru vyšetřeni.

Botulotoxin C byl jako příčina masového hynutí volně žijícího vodního ptactva diagnostikován v Československu poprvé nedaleko území VDNM na Pohořelicku (Hubálek aj., 1982, 1984), později i na dalších lokalitách (Racháč, 1984). Podobně jako v zahraničí (Haagsma, 1974; Graham aj., 1978; Wobeser aj., 1983), i v Československu jsou v poslední době zaznamenávány případy aviárního botulismu v jarním období (Racháč 1984, 1986). Na VDNM se rovněž vytvořila situace, kdy po proběhlé letně podzimní epizootii 1988 hynuli ptáci i v předjaří a na jaře 1989. Postiženy byly především druhy kachen rodů *Aythya* a *Bucephala*, potápějící se za potravou na dno vodních nádrží — v souladu s pozorováními autorů Racháč (1986) a Wobeser aj. (1983). Tyto jarní úhyny jsou vysvětlitelné perzistencí toxinu *C. botulinum* C ve vodních ekosystémech přes chladné zimní období (Graham aj., 1978; Hubálek a Halouzka, 1988). Vzhledem k tomu, že převážná část vodních organismů hyne na podzim a zimu přežívají nové generace v podobě spor, vajíček nebo kukel, vyskytuje se v časném jarním období ve vodních ekosystémech pouze malé množství organismů, které mohou fungovat jako konzervy botulotoxinu, vytvořeného *Clostridium botulinum* v podzimních měsících. Při toxikologickém vyšetřování různých neaviárních materiálů ve vodním ekosystému jsme prokázali jed *C. botulinum* C pouze v sarkofágních muších larvách rodů *Calliphora* a *Lucilia*, a to ve značné koncentraci. Ve shodě s řadou dalších autorů (Duncan a Jensen, 1976; Wobeser aj., 1983; Shayegani aj., 1984; Racháč, 1986; Grüll aj., 1987) se domníváme, že tyto bezobratlí jsou hlavním rezervoárem toxinu ve vodních ekosystémech a zdrojem nákazy obratlovců. Larvy dipter z kadaverů se na podzim buď zakuklí na souši (pokud se kadavery nacházejí u břehu nebo přímo na souši), nebo jsou spláchnuty do vody, zahynou a některá jejich těla jsou přes zimu uchována v chladné vodě u dna. Tyto pak mohou sloužit jako potrava potápivým druhům a zdroj intoxikace v jarním období následujícího roku. Jen ojediněle je zjišťován botulotoxin v jiných složkách vodního prostředí. Tak např. Neubauer aj. (1988) detekovali menší množství toxinu v zooplanktonu střední zdrže VDNM. Naproti tomu za hlavní rezervoár bakterie *C. botulinum* typ C je všeobecně považována půda a bahno eutrofických vodních nádrží a toků (Smith, 1978; Neubauer aj., 1988).

Dosavadní epizootická situace aviárního botulismu na VDNM je odrazem podmínek prostředí, zejména úrovně vodní hladiny, eutrofizace a organického znečištění vody v nádržích. Nízký stav vodní hladiny vede k vytváření rozsáhlejších mělčin s intenzivněji prohřivanou vodou a lepšími podmínkami pro růst *C. botulinum* i pro tvorbu toxinu. Kromě zvýšené teploty dalším důležitým činitelem podporujícím toxinogenezi je deficit kyslíku ve vodě mělkých pobřežních partií. Ten vzniká v důsledku silného rozvoje a následného tlení měkké vodní vegetace a poklesu koncentrace kyslíku ve vodě, někdy také při zvětření hlubších neoxidovaných vrstev dna nádrží během vlnobití. Značná rozloha nádrží

umožňuje totiž častý vznik intenzivních vlnobití (Heteša a Marvan, 1984).

Prognóza epizootické situace doposud nestabilizovaných biotopů VDNM bude podmíněna především stavem vodní hladiny (plochou mělčin) a meteorologickými podmínkami, zejména teplotou v kritickém období (květen až září).

Možnosti prevence a profylaxe aviárního botulismu jsou omezené. Patří k nim např. výstavba čistících stanic, pohyb (zvýšení) vodní hladiny, pravidelná odstraňování ptačích kadaverů (asanační služba) a transport živých, slaběji intoxikovaných jedinců na nezasazené biotopy. K terapii lze s částečným úspěchem využít antibotulinického séra.

Poděkování

Za pomoc při sběru materiálu děkujeme RNDr. J. Hetešovi, CSc., MVDr. K. Peštálovi a J. Peškovi, za určení larev dipter prof. ing. dr. D. Povolnému a za poskytnutí údajů mikrobiologického vyšetření ptáků MVDr. Z. Kožušníkově a MVDr. K. Peštálovi. Za pečlivou asistenci při laboratorním zpracování vzorků děkujeme L. Ševčíkové.

Literatura

- DEMEK, J. — MACKA, M.: Pavlovské vrchy a jejich okolí. Stud. geogr., 11, 1970, s. 1—198.
- DUNCAN, R. M. — JENSEN, W. I.: A relationship between avian carcasses and living invertebrates in the epizootiology of avian botulism. J. Wildl. Dis., 12, 1976, s. 116—126.
- GRAHAM, J. M. — SMITH, G. R. — BORLAND, E. D. — McDONALD, J. W.: Avian botulism in winter and spring and the stability of *Clostridium botulinum* type C toxin. Veter. Rec., 102, 1978, s. 40—41.
- GRÜLL, A. — RAUER, G. — SAGMEISTER, H.: Ökologische Untersuchungen am Wasservogel-Botulismus im Seewinkel (Neusiedler See-Gebiet). Wiss. Arb. Burgenland, Sonderband, 77, 1987, s. 301—351.
- HAAGSMA, J.: Etiology and epidemiology of botulism in waterfowl in the Netherlands. Tijdschr. Diergeneesk., 99, 1974, s. 434—442.
- HETEŠA, J. — MARVAN, P.: Biologie nově napuštěné nádrže. Stud. [Českoslov. Akad. Věd], 3, 1984, s. 1—175.
- HUBÁLEK, Z. — HALOUZKA, J.: Thermal sensitivity of *Clostridium botulinum* type C toxin. Epidem. Inf., 101, 1988, s. 321—325.
- HUBÁLEK, Z. — HUDEC, K. — NEUBAUER, M. — PELLANTOVÁ, J.: Botulismus vodních ptáků na rybníku Starý u Pohořelic (okres Břeclav). Veter. Med. [Praha], 29, 1984, s. 747—752.
- HUBÁLEK, Z. — HUDEC, K. — PELLANTOVÁ, J.: Botulism in wild waterfowl in southern Moravia (Czechoslovakia). Folia parasit. [Praha], 29, 1982, s. 331—332.
- HUDEC, K. — PELLANTOVÁ, J.: Massensterben der Wasservogel in der ČSSR. Beitr. Vogelkd. [Jena], 31, 1985, s. 81—92.
- HUDEC, K. — PELLANTOVÁ, J. — RACHAČ, V.: Hromadné úhyny vodního ptactva v ČSSR. In: PELLANTOVÁ, J. — HUDEC, K. (eds): Vodní ptactvo a jeho prostředí v ČSSR. Brno, ÚVO ČSAV 1984, s. 81—88.
- CHYTIL, J.: Nutnost výstavby čistících stanic potvrzují umírající ptáci. Nový život [Břeclav], č. 37, 1988, s. 4.
- CHYTIL, J.: Místo ochránáře — hrobníkem. Malovaný kraj [Břeclav], 25, 1989a, č. 1, s. 14—15.
- CHYTIL, J.: Botulismus na jižní Moravě v roce 1988. Sbor. České Budějovice, 1989b, v tisku.
- KOŠKOVÁ, E. — PELLANTOVÁ, J.: Racionální využití výsledků výzkumu v oblasti vodo hospodářských úprav jižní Moravy. Brno, VÚV-KRB 1988, s. 1—187.
- NEUBAUER, M. — HUDEC, K. — PELLANTOVÁ, J.: The occurrence of *Clostridium botulinum* type C bacterium and botulotoxin in an aquatic environment in southern Moravia. Folia zool., 37, 1988, s. 255—262.
- RACHAČ, V.: Botulismus drůbeže, bažantů a volně žijících vodních ptáků v Jihočeském kraji. Veterinářství, 34, 1984, s. 365—368.

RACHAČ, V.: Botulismus vodních ptáků v předjaří a jarním období. Veterinářství, 36, 1986, s. 135—137.
 SHAYEGANI, M. — STONE, W. B. — HANNETT, G. E.: An outbreak of botulism in waterfowl and fly larvae in New York State. J. Wildl. Dis., 20, 1984, s. 86—89.
 VESECKÝ, A.: Podnebí ČSSR — Tabulky. Praha HMÚ, 1961, s. 1—379.
 WOBESER, G. — RAINNIE, D. J. — SMITH-WINDSOR, T. B. — BOGDAN, G.: Avian botulism during late autumn and early spring in Saskatchewan. J. Wildl. Dis., 19, 1983, s. 90—94.

Došlo dne 11. 12. 1989

HUBÁLEK, Z. — PELLANTOVÁ, J. — HUDEC, K. — HALOUZKA, J. — CHYTIL, J. — MACHÁČEK, P. — ŠEBELA, M. — KUBÍČEK, F. — (Institute of Systematic and Ecological Biology of the Czechoslovak Academy of Sciences, Brno; Administration of the Pálava Protected Landscape Region, Mikulov; Regional Museum, Mikulov; Moravian Museum, Brno; Faculty of Science of Jan Evangelista Purkyně University, Brno): *Botulism of birds living in the region of the Nové Mlýny artificial lakes (Brzeclav district)*. Veter. Med., (Praha), 36, 1991: 57—63.

Epizootic of wild water birds caused by the toxin *Clostridium botulinum* of C type occurred in extensive shallow artificial lakes of the Nové Mlýny dam system from May to October 1988 and later on from February to early April 1989. In total more than 3.000 dead or dying birds of 44 species were found, the following orders were prevailing: *Anseriformes* (56 %), *Lariiformes* (33 %), *Charadriiformes* (6 %) and *Ralliformes* (4 %). Botulotoxin was detected at high concentrations in sarcophagic fly larvae of *Calliphora vomitoria* and *Lucilia sericata* which were collected in bird cadavers, but it was not found in different components of the aquatic environment [water, submersed vegetation, phytoplankton, zooplankton, *Gastropoda*, *Crustacea*, *Oligochaeta*, larvae of *Odonata*, *Chironomidae* and *Ceratopogonidae*]. Future development of the epizootic situation in the Nové Mlýny artificial lakes will depend on the water level and meteorological conditions in the critical period [May to September].

water birds; botulism; *Clostridium botulinum* of C type; sarcophagic flies

Adresy autorů:

RNDr. Zdeněk Hubálek, DrSc., RNDr. Jitka Pellantová, RNDr. Karel Hu-
 dec, CSc., RNDr. Jiří Halouzka, Ústav systematické a ekologické biologie ČSAV,
 Květná 8, 603 65 Brno
 RNDr. Josef Chytil, Správa CHKO a BR Pálava, Fučíkovo nám. 32, 692 01 Mikulov
 RNDr. Petr Macháček, CSc., Regionální muzeum, 692 15 Mikulov
 RNDr. Miroslav Šebela, CSc., Moravské muzeum, nám. 25. února 6, 659 37 Brno
 RNDr. František Kubíček, CSc., Přírodovědecká fakulta UJEP, Kotlářská 2, 600 00
 Brno

BULLETIN EHS
(zemědělství, výživa)

Cílem Bulletinu EHS je průběžně poskytovat informace z literárních zdrojů (časopisů, periodik i neperiodik) v oblasti zemědělství a potravinářství. Rozsah informací je podáván v podobě vybraných překladů či výtahů z článků a ustanovení základního významu a formou anotací z literatury o EHS dostupné ve fondu Ústřední zemědělské a lesnické knihovny ÚVTIZ.

Bulletin EHS operativně informuje o základním ekonomicko-politickém i technickém dění v členských zemích EHS i v centrále v Bruselu.

Podstatnou částí bulletinu je též pravidelný oddíl Z obsahu deníku EHS, který obsahuje překlad obsahu deníku *Journal officiel des Communautés européennes*, jak jeho řady L (*Législation*), tak řady C (*Communications et informations*).

Časopis vychází 2krát měsíčně.

Cena jednoho čísla je 15 Kčs, celoroční předplatné je 360 Kčs.

Prostřednictvím Bulletinu EHS chceme přispět k větší informovanosti pracovníků všech sfér národního hospodářství zabývajících se problematikou vztahů mezi ČSFR a zeměmi EHS.

Objednávky zasílejte na adresu:

Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství
Slezská 7, 120 56 Praha - oddělení odbytu a propagace

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 2/91 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny tyto příspěvky:

- J. Říha, J. Minář, A. Vlček, D. Bartoňková: Účinnost repelentů dietyltoluamidu a fenypropandiolu u pasených prvotek
- M. Pješčak, Š. Kováč, J. Černek: Vplyv antihelmintického preparátu Fenbion na krvný obraz jalovic
- L. Massanyi, J. Trandžík: Analyzovanie pohyblivosti býčích spermií v čerstvých ejakulátoch komputerovou technikou
- M. Kudweis, Z. Lojda, I. Juliš: Histochemie kyselých fosfatázy ve sliznici tenkého střeva při experimentální kokcidioze sajících selat
- A. Staníková, V. Rajtová, J. Arendarčík: Zmeny v hypotalame a prílohnom endodýme bahníc po hormonálnej stimulácii ovárií
- J. Neuschl: Vplyv veku králikov na niektoré farmakokinetické parametre oxytetracyklínu a rolitetracyklínu
- L. Fukal, M. Marek: Screeningová metoda pro imunochémické simultánní stanovení aflatoxinu a ochratoxinu A v obilninách a krmivech

KRÁTKÉ SDĚLENÍ

- I. Pavlásek: Využití glycerínu při detekci oocyst *Cryptosporidium parvum* a *C. baileyi* v trusu savců a ptáků

Rukopisy odevzdány k tisku 15. 11. 1990 — Podepsáno k tisku 17. 7. 1991

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA • Vydává Československá akademie zemědělská — Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství • Vychází měsíčně • Redaktorka ing. Zdeňka Radošová • Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 25 75 41 • Vytiskly OSTRAVSKÉ TISKÁRNĚ, s. p., Ostrava 1, Novinářská 7
© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1990

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, 28. října 206, 709 90 Ostrava 9.