

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

4

ROČNÍK 36 (LXIV)
PRAHA
DUBEN 1991
CS ISSN 0375-8427

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚĚLSTVÍ

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

Vedoucí redaktorka ing. Zdeňka Radošová

OBSAH

Šimoník I., Pavelka J., Kudláč E.: Kontaminace cervikálního hlenu krav chemickými prvky ve vztahu ke koncepci a věku	193
Feješ J., Breyl I., Šalitrošová H.: Detekcia reziduí niektorých cudzoročných látok v tkanivách genitálu býkov a kráv a v sperme býkov	203
Mazurová J., Vinter P.: Účinnosť vybraných antibiotík na mikroorganizmy kontaminujúci ejakuláty kanců	213
Kudweis M., Lojda Z., Juliš I.: β -D-glukosidáza mikrovilózní zóny enterocytů tenkého střeva při experimentální kokcidióze sajčích selat	225
Svobodová V.: Sarkocystóza jehňat	235
Ruprich J., Ostrý V.: Enzymoimunologické stanovení mykotoxinu ochratoxin A	245
Fukal Z., Marek M.: Screeningová metoda pro imunochemické simultánní stanovení aflatoxinu a ochratoxinu A v obilninách a krmivech	251

INFORMACE

Pavlásek I.: Využití glycerínu při detekci oocyst <i>Cryptosporidium parvum</i> a <i>C. baylei</i> v trusu savců a ptáků	255
--	-----

CONTENTS

Šimoník I., Pavelka J., Kudláč E.: Chemical contamination of cervical mucus in cows in relation to conception and age	202
Feješ J., Breyl I., Šalitrošová H.: Detection of residues of some foreign substances in the tissues of bull and cow genitals and in bull sperm	211
Mazurová J., Vinter P.: The effects of some antibiotics on microorganisms contaminating boar ejaculates	222
Kudweis M., Lojda Z., Juliš I.: β -D-glucosidase of the microvillous zone of small intestine enterocytes in the experimental coccidiosis of sucking farrows	234
Svobodová V.: Sarcocystosis of lambs	243
Ruprich J., Ostrý V.: Enzymoimmunological assays of the mycotoxin ochratoxin A	249
Fukal Z., Marek M.: Screening method for immunochemical simultaneous determination of aflatoxin and ochratoxin A in cereals and feeds	254

KONTAMINACE CERVIKÁLNÍHO HLENU KRAV CHEMICKÝMI PRVKY VE VZTAHU KE KONCEPCI A VĚKU

I. Šimoník, J. Pavelka, E. Kudláč

SIMONÍK, I. — PAVELKA, J. — KUDLÁČ, E. [Okresní veterinární správa, Karviná; Státní veterinární ústav, Ostrava-Martinov; Vysoká škola veterinární, Brno]: *Kontaminace cervikálního hleny krav chemickými prvky ve vztahu ke koncepci a věku*. Veter. Med. [Praha], 36, 1991 (4): 193–202.

Metodou absorpční atomové spektrometrie (AAS) jsme prokázali kontaminaci cervikálních hlenů chemickými prvky — Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, Zn v období říje krav v různých ekologických zemědělských oblastech Severomoravského kraje. Výsledky sledování odhalily pouze statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) v obsahu Cd ve sledovaných skupinách, pokusná skupina $\bar{x} = 0,015 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Cd, kontrolní skupina $\bar{x} = 0,006 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Cd. Nálezy Cr v cervikálním hleny jsou prioritní, stejně jako nálezy Cu. Bylo zjištěno, že Zn je prvek, který negativně ovlivňuje koncepci krav. Byly prokázány signifikantně vyšší ($P < 0,01$) hodnoty Zn v cervikálních hlenech nezabřezlých krav (skupina koncepce — = $0,841 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Zn, skupina koncepce + = $0,219 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Zn). Jako obraz celkové kontaminace cervikálního hleny jsme navrhli a hodnotili tzv. sumu chemických prvků — Cd + Pb + Hg + Cr + Cu + Zn. Tento ukazatel byl rovněž ovlivněn nálezy Zn ve skupině březích a nezabřezlých krav. Antagonismus Zn: Cd v cervikálních sekretech jalových a zabřezlých krav byl specificky vysoce průkazný ($P < 0,01$). Stanovení chemických prvků v cervikálních hlenech bylo provedeno v digerovaném vzorku cervikálního sekretu námi poprvé. Pomocí korelačních koeficientů bylo zjištěno u krav ($n = 99$) z exponované oblasti, že obsah chemických prvků v cervikálním sekretu nebyl ovlivněn věkem krav. S rostoucím věkem se nezvyšoval obsah chemických prvků v cervikálním sekretu.

skot; cervikální sekret; chemické prvky Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, Zn; exponovaná oblast; relativně čistá oblast; koncepce; věk

Cervikální sekret je produktem epiteliálních buněk sliznice děložního krčku, v době říje je hlavním viditelným fenoménem vrcholu říjového cyklu skotu (Polášek aj., 1985). Je pak prokázáno, že kvantita a kvalita cervikálního hleny je přímým odrazem stadia pohlavního cyklu, jmenovitě hladin gonadálních hormonů (Kudláč a Elečko, 1987). Fyzikální a biochemické vlastnosti cervikálního hleny jsou v literatuře dobře známé. Tuto problematiku studovala celá řada autorů (Horský a Presl, 1978; Gamčík aj., 1980; Rob, 1985; Šimoník a Kudláč, 1991).

Vliv reziduí chemických prvků na organismus hospodářských zvířat je různý, některé poměrně rychle narušují funkci orgánů, jiné se kumulují, snižují odolnost vůči infekcím, narušují reprodukční schopnost zvířat

a škodlivě zasahují do vývoje juvenilních jedinců. Chemické prvky negativně zasahují do reprodukční sféry účinkem cytotoxickým, embryotoxickým, fetotoxickým, teratogenním, mutagenním a karcinogenním tím, že pronikají a kumulují se v reprodukčních orgánech (Bencko aj., 1984). Wudl a Sherman (1983) uvádějí, že toxické prvky, včetně těžkých kovů, vyvolávají cytotoxicitu při prostupu do sekretů pohlavního ústrojí a dochází k narušení embrya. Zároveň je prokázána jejich výrazná tendence ke kumulaci v pohlavním ústrojí (Rob, 1985). Jedním z mnoha vážných nebezpečí chronického přívodu toxických látek (Cd, Hg, Pb) do organismu je i pozvolné narušování reprodukčních funkcí samců a samic hospodářských zvířat, které v postižených oblastech mohou vyvolávat závažné ekonomické ztráty (Rob, 1985).

Vývodné pohlavní cesty jsou jednou z vylučovacích cest organismu zvířete. Rob (1985) jako první detekoval toxické prvky Cd, Pb, Hg, Mo, V, Zn v cervikálních sekretech krav a uvádí výraznou spermiotoxicitu genitálních sekretů *in vitro* v chovech se sníženou plodností. Růžička (1986) detekoval Cd u 23 říjových hlenů a uvádí nálezy $< 0,02$ až $0,02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd. Nicméně práce výše citovaných autorů nestudovaly vztah chemických prvků v genitálních sekretech k individuální plodnosti. Cílem našeho šetření bylo stanovit kontaminaci cervikálního sekretu krav chemickými prvky ve vztahu ke koncepci a věku.

MATERIÁL A METODA

Cervikální hlen byl odebrán od 99 dojnic černostrakatého nížinného plemene ve věku 24–109 měsíců s minimální užitkovostí 4000 kg mléka ročně, ve spontánní říji minimálně 42 dní *post partum*, na farmě v exponované oblasti na průmyslový spád (VKK 1 R).

Srovnávací studie — odběr sedmi vzorků cervikálního hlenu, byl proveden od sedmi náhodně vybraných dojnic černostrakatého nížinného plemene s minimální užitkovostí 3700 kg mléka ročně ve spontánní říji, minimálně 42 dní *p. p.* v relativně čisté oblasti (ZD Dol).

Po odběru cervikálního sekretu byla jak v pokusné, tak i kontrolní skupině do 30 min provedena umělá inseminace do děložního cervixu zmrazeným spermatem (pokusná skupina = 1.—4. inseminace, kontrolní skupina = 1.—3. inseminace *p. p.*).

Odběr cervikálního hlenu byl prováděn po předchozím zevním, vaginálním a rektálním vyšetření pohlavních orgánů krav a klinickém posouzení fenoménu říje (otevření cervixu, hyperemie sliznic, Graafův folikul, přítomnost hlenu). Plemenice, u nichž říje vykazovala atypické příznaky, byly z šetření vyloučeny. Optimální doba inseminace — říje byla v pokusné skupině kontrolována stanovením progesteronu v mléce radioimunoanalýzou odstředěného mléka (Hruška aj., 1983a, b). Vlastní odběr říjového sekretu před provedením inseminace spontánně se říjících krav byl prováděn sterilními a chemicky čistými pipetami. Odběr byl proveden pod vizuální kontrolou s pomocí vaginálního spekula z okolí zevní branky děložního krčku v minimálním množství 10 g. Takto získaný cervikální hlen byl přenesen do chemicky čistých a sterilních vzorkovnic, které byly okamžitě uzavřeny a vzorky cervikálního sekretu byly bezprostředně zamrazeny na teplotu -18°C až do doby chemické analýzy metodou atomové absorpční spektrometrie. V cervikálních hlenech metodou AAS byly detekovány tyto chemické prvky: Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, Zn.

Detekce chemických prvků v cervikálních hlenech byla prováděna v chovu v době nízké koncepce po 1. inseminaci 39,3 %, interval 67,9 dne a délka SP 101,5 dne.

Stanovení chemických prvků bylo provedeno v digerovaném vzorku metodou plamenové techniky atomové absorpční spektrometrie u prvků Cd, Pb, Cr, Cu a Zn na přístroji Perkin Elmer model 2380 v plameni acetylén—vzduch. Hg byla stanovena bez předchozí úpravy vzorků cervikálního sekretu na přístroji Trace Monitor TMA 254. Podmínky stanovení jednotlivých prvků byly převzaty z firemní literatury výše uvedených přístrojů.

Výsledky koncepce — zabřeznutí byly zjišťovány metodou rané diagnostiky gravidity (40–50 dnů po inseminaci).

Matematicko-statistické vyhodnocení údajů bylo provedeno na počítači TNS pomocí programů následujícími statistickými metodami:

- závislost zabřeznutí na kvalitativních znacích (pořadí inseminace) byla zjišťována pomocí kontingenčních tabulek a z nich vycházejícího testu nezávislosti,
- pro srovnání rozdílů mezi průměry zabřezlých a nezabřezlých krav byl pro vybrané znaky použit *t*-test,
- závislost obsahu chemických prvků v cervikálním hlenu na věku krav byla ověřována pomocí korelačních koeficientů.

VÝSLEDKY

Ze statistického souboru 99 krav v exponované oblasti 56 dojnic zabřezlo v době 1.—4. inseminace, tj. 56,57 % a 43 dojnic zůstalo jalových, tj. 43,43 %. Z relativně čisté oblasti (kontrolní skupina $n = 7$) 5 krav zabřezlo, tj. 71,43 % a 2 plemence zůstaly jalové, tj. 28,57 %. Přehled výsledků koncepce pokusné a kontrolní skupiny uvádí tab. I.

Zjistili jsme, že výsledky koncepce v pokusné skupině neovlivnilo pořadí inseminace, jak znázorňuje tab. II. Test závislosti březosti na pořadí inseminace nebyl proveden pro malý statistický soubor v kontrolní skupině. Výsledky progesteronového testu v mléce v pokusné skupině ukázaly, že všem plemenicím ($n = 99$) byl cervikální sekret odebrán v optimální době inseminace $\bar{x} = 0,19 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ progesteronu. Progesteronový test v kontrolní skupině nebyl proveden.

Obsahy chemických prvků v cervikálních hlenech krav v pokusné skupině ($n = 99$) v exponované oblasti a v kontrolní oblasti ($n = 7$)

I. Výsledky koncepce pokusné a kontrolní skupiny krav s odběrem cervikálního hlenu — The results of conception in the test and control group of cows where the samples of cervical mucus were taken

Ukazatel ¹	Skupina ⁴			
	pokusná ⁵		kontrolní ⁶	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Koncepce ² +	56	56,57	5	71,43
Koncepce ² —	43	43,43	2	28,57
Celkem ³	99	100,00	7	100,00

¹characteristic, ²conception, ³total, ⁴group, ⁵test, ⁶control

II. Koncepce dojnic v závislosti na pořadí inseminace v pokusné skupině — The conception of dairy cows in dependence on the order of insemination in the test group

Ukazatel ¹	Pořadí inseminace ³ p. p.				Celkem krav ⁴
	1.	2.	3.	4.	
Koncepce ² +	28	15	8	5	56
Koncepce ² —	22	10	8	3	43
Koncepce ² ±	50	25	16	8	99

Znaky jsou na sobě nezávislé pro $\alpha = 0,05$ — The traits are independent of each other for $\alpha = 0,05$

For 1—2 see Tab. I; ³order of insemination, ⁴total number of cows

jsou uvedeny v tab. III. Výsledky sledování odhalily pouze statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$) v obsahu Cd ve sledovaných skupinách; pokusná skupina $\bar{x} = 0,015 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Cd, kontrolní skupina $\bar{x} = 0,006 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Cd. Výsledky „sumy chemických prvků“ v genitálních sekretech krav pokusné a kontrolní skupiny, jak uvádí tab. III, nebyly statisticky odlišné. Antagonismus Zn a Cd v cervikálních hlenech krav pokusné skupiny a kontrolní skupiny je rovněž uveden v tab. III. Bylo zjištěno, že v pokusné skupině ($n = 99$) byl průměrný poměr Zn : Cd v cervikálních hlenech 35,89 : 1 a v kontrolní skupině ($n = 7$) byl průměrný poměr Zn : Cd 86,87 : 1 při vysoce signifikantní průkaznosti ($P < 0,01$).

Tab. IV uvádí obsahy jednotlivých chemických prvků v genitálních sekretech krav v pokusné skupině ($n = 99$), v exponované oblasti rozdělené na zabřezlé dojnice ($n = 56$) a jalové dojnice ($n = 43$). Z tab. IV je patrné, že nebyla zjištěna statistická průkaznost v obsahu Cd, Pb, Hg, Cr a Cu ve skupině březích plemenic a ve skupině jalových plemenic v exponované oblasti. Statisticky vysoce průkazně ($P < 0,01$) se odlišuje obsah Zn ve skupině krav zabřezlých $\bar{x} = 0,219 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Zn ve srovnání se skupinou krav jalových $\bar{x} = 0,622 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Zn. Sledováním byl zjištěn vysoce statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,01$) v obsahu průměrné „sumy chemických prvků“ mezi skupinou krav zabřezlých a jalových v exponované oblasti. Ve skupině březích plemenic ($n = 56$) byla průměrná „suma chemických prvků“ $\bar{x} = 0,395 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ chemických prvků, ve skupině jalových krav ($n = 43$) byla průměrná „suma chemických prvků“ $\bar{x} = 0,841 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ chemických prvků. Tyto údaje jsou uvedeny v tab. IV, z které je patrné, že byl zjištěn vysoce signifikantní rozdíl ($P < 0,01$) v antagonismu Zn : Cd ve skupině březích plemenic a jalových plemenic. Ve skupině březích plemenic byl průměrný antagonismus Zn : Cd 22,98 : 1, u jalových 52,71 : 1.

Tab. V uvádí obsahy jednotlivých chemických prvků a „sumu chemických prvků“ v kontrolní skupině ($n = 7$) z relativně čisté oblasti rozdělené na zabřezlé plemenic ($n = 5$) a jalové plemenic ($n = 2$). Nelze objektivně provést statistické hodnocení pro malý počet zvířat ve skupině jalových plemenic z relativně čisté oblasti. V souladu s jalovými plemenicemi ($n = 43$) z exponované oblasti byly zjištěny vyšší průměrné obsahy Zn u skupiny jalových plemenic z relativně čisté oblasti $\bar{x} = 1,095 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Zn, ve srovnání se skupinou zabřezlých ($n = 5$) z relativně čisté oblasti, průměrný obsah Zn v této skupině byl $\bar{x} = 0,236 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Zn. „Suma chemických prvků“ u skupiny jalových plemenic z relativně čisté oblasti $\bar{x} = 1,255 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ chemických prvků byla vyšší než průměrná „suma chemických prvků“ u skupiny zabřezlých plemenic z relativně čisté oblasti $\bar{x} = 0,357 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ chemických prvků. Z těchto zjištění lze dedukovat, že Zn také v této neexponované oblasti negativně ovlivňuje výsledky koncepce.

Tab. VI uvádí závislost obsahu chemických prvků v cervikálních hlenech krav z exponované oblasti ($n = 99$) na jejich věku. Tato závislost byla ověřována pomocí testu korelačních koeficientů, kde nulovou hypotézou bylo $r = 0$. Test pro korelační koeficient $r = 0$, kritická hodnota $0,20 = 5 \%$. Závislost obsahu chemických prvků v cervikálních hlenech na věku krav nebyla zjištěna, neboť hodnoty korelačních koeficientů nebyly průkazně odlišné od nuly.

III. Obsah chemických prvků [$\mu\text{g}\cdot\text{g}$] v cervikálních hlenech krav pokusné a kontrolní skupiny — The content of chemical elements [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$] in the cervical mucus of cows of the test and control group

Ukazatel ¹	Skupina ³						Ukazatel ¹	
	pokusná ⁴ (n = 99)			kontrolní ⁵ (n = 7)				
Chemický prvek ²	$\bar{x}$	$\bar{x}_{\min}$	$\bar{x}_{\max}$	$\bar{x}$	$\bar{x}_{\min}$	$\bar{x}_{\max}$	t [h]	statistická průkaznost ⁶
Cd	0,015	0,000	0,050	0,006	0,001	0,009	2,167	P < 0,05
Pb	0,058	0,000	0,470	0,058	0,040	0,085	0,004	—
Hg	0,0005	0,0000	0,0030	0,0000	0,0000	0,0000	1,543	—
Cr	0,028	0,000	0,240	0,026	0,010	0,040	0,156	—
Cu	0,098	0,000	0,690	0,044	0,030	0,090	1,304	—
Zn	0,394	0,003	1,730	0,481	0,070	1,180	0,616	—
Suma chemických prvků ⁷	0,589	0,055	2,209	0,614	0,165	1,354	0,147	—
Antagonismus ⁸ Zn : Cd	35,89 : 1	0,00	178,57 : 1	86,87 : 1	10,00 : 1	144,28 : 1	3,289	P < 0,01

¹characteristic, ²chemical element, ³group, ⁴test, ⁵control, ⁶statistical significance, ⁷sum of chemical elements, ⁸antagonism

IV. Obsah chemických prvků [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$] v cervikálních hlenech zabřezlých a nezabřezlých krav pokusné skupiny — The content of chemical elements [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$] in the cervical mucus of pregnant and nonpregnant cows of the test group

Ukazatel ¹	Skupina pokusná ³ (n = 99), ⁴ exponovaná oblast						Ukazatel ¹	
	koncepce ⁵ + (n = 56)			koncepce ⁵ – (n = 43)				
Chemický prvek ²	$\bar{x}$	$\bar{x}_{\min}$	$\bar{x}_{\max}$	$\bar{x}$	$\bar{x}_{\min}$	$x_{\max}$	t [h]	statistická průkaznost ⁶
Cd	0,015	0,000	0,050	0,015	0,000	0,040	0,004	—
Pb	0,061	0,000	0,470	0,053	0,000	0,250	0,503	—
Hg	0,0005	0,0000	0,0030	0,0005	0,0000	0,0030	0,110	—
Cr	0,024	0,000	0,188	0,032	0,000	0,240	1,192	—
Cu	0,084	0,015	0,570	0,118	0,000	0,690	1,560	—
Zn	0,219	0,003	0,640	0,622	0,005	1,730	6,685	P < 0,01
Suma chemických prvků ⁷	0,395	0,055	0,917	0,841	0,118	2,210	5,886	P < 0,01
Antagonismus ⁸ Cd : Zn	22,98 : 1	00,00	150,00 : 1	52,71 : 1	00,00	178,57:1	4,032	P < 0,01

For 1—2, 6—8, see Tab. III; ³test group, ⁴contaminated area, ⁵conception

V. Obsah chemických prvků [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$] v cervikálních hlenech zabřezlých a nezabřezlých krav kontrolní skupiny — The content of chemical elements [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$] in the cervical mucus of pregnant and nonpregnant cows of the control group

Ukazatel ¹	Skupina kontrolní ³ ($n = 7$), relativně čistá oblast ⁴					
	koncepce ⁵ + ($n = 5$)			koncepce ⁵ - ($n = 2$)		
Chemický prvek ²	$\bar{x}$	$\bar{x}_{\min}$	$\bar{x}_{\max}$	$\bar{x}$	$\bar{x}_{\min}$	$\bar{x}_{\max}$
Cd	0,005	0,001	0,008	0,008	0,007	0,009
Pb	0,050	0,040	0,060	0,076	0,070	0,085
Hg	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Cr	0,021	0,010	0,030	0,038	0,035	0,040
Cu	0,046	0,030	0,090	0,038	0,035	0,040
Zn	0,236	0,070	0,460	1,095	1,010	1,180
Suma chemických prvků ⁶	0,357	0,165	0,586	1,255	1,157	1,354

For 1—2, see Tab. III; ³control group, ⁴relatively uncontaminated area, ⁵conception, ⁶sum of chemical elements

VI. Závislost obsahu chemických prvků v cervikálních hlenech krav na věku v pokusné skupině ($n = 99$). Korelační matice — Dependence of the content of chemical elements in the cervical mucus of cows in the group ($n = 99$). Correlation matrix

Ukazatel ¹	Chemický prvek ²					
Věk krav ³ 24—109 měsíců]	Cd	Pb	Hg	Cr	Cu	Zn
	—0,03	—0,04	0,02	—0,10	0,14	0,04

Test pro $r = 0$, kritická hodnota 5 % = 0,20 — Test for $r = 0$, critical value 5 % = 0,20

¹characteristic, ²chemical element, ³age of cows [months]

DISKUSE

V literatuře je poměrně málo údajů o vztahu cizorodých látek k plodnosti hospodářských zvířat. Rob (1985) prokázal vylučování chemických prvků (Cd, Pb, Hg, Mo, V, Zn) genitálními sekrety krav v období říje. Výše citovaný autor našel vysoká rezidua uvedených chemických prvků v říjových sekretech krav v zemědělských podnicích vykazujících snížené výsledky plodnosti.

Analýzy chemických prvků (Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, Zn) prováděné v cervikálních sekretech krav z obou srovnávacích zemědělských závodů z různých exponovaných oblastí Severomoravského kraje prokázaly vylučování uvedených chemických prvků genitálními sekrety krav v období říje.

Chemické analýzy cervikálních hlenů krav pokusné a kontrolní skupiny našeho šetření odhalily obsahy Cd v průměru o 10^{-1} až 10^{-2} nižší hodnoty, u Pb hodnoty o 10^{-2} nižší, u Hg hodnoty v průměru o 10^{-2} nižší a konečně u Zn byla průměrná hodnota o 10^{-1} nižší než uvádí Rob (1985). Výsledky analýz metodou AAS prokázaly, že také Cr a Cu jsou chemické prvky, které jsou genitálními sekrety v období říje vylučovány. Současná literatura neuvádí údaje o vylučování Cr a Cu genitálním sekretem. V tomto směru výsledky našich šetření jsou prioritní povahy.

Literatura rovněž neuvádí údaje o vztahu chemických prvků k plodnosti zvířat a skotu tak, jak bylo vytyčeno v našem sledování.

Chemické analýzy cervikálních hlenů pokusné skupiny ($n = 99$) a kontrolní skupiny ($n = 7$) neprokázaly statistické rozdíly v obsahu Pb, Hg, Cr, Cu a Zn v cervikálních sekretech krav z exponované oblasti ve srovnání s relativně čistou oblastí (tab. III). Výsledky analýz prokázaly pouze statistickou průkaznost ($P < 0,05$) v obsahu Cd v cervikálních hlenech krav z exponované a neexponované oblasti, přičemž kontaminace cervikálních hlenů krav v obou skupinách pravděpodobně závisela na zdrojích znečištění biotopu Cd, jak uvádějí někteří autoři (např. Findejsová aj., 1982; Köhnert, 1983; Cibulka, 1986).

Vysoce statistické rozdíly ($P < 0,01$) v antagonismu Zn : Cd byly ovlivněny mezi pokusnou a kontrolní oblastí v cervikálních hlenech krav statisticky průkazně ($P < 0,05$) nižšími průměrnými obsahy Cd v kontrolní skupině (tab. III). Antagonismus Zn : Cd byl hodnocen v cervikálních hlenech z důvodu, že četné literární údaje, např. Bencko aj. (1984) uvádějí, že Zn a Cd jsou antagonistické prvky.

Výsledky koncepce v exponované oblasti ve vztahu k obsahu chemických prvků v cervikálních hlenech krav byly jednoznačně ovlivněny statisticky vysoce průkazně ($P < 0,01$) pouze vyššími průměrnými obsahy Zn v cervikálních hlenech nezabřezlých krav. Zdrojem zinkových emisí v exponované oblasti byla zinkovna n. p. Autopal Nový Jičín, závod Rychvald, která se nachází 1 km od objektu VKK 1 R, ve kterém byly tyto cervikální hleny odebírány a později analyzovány. V relativně čisté oblasti u krav nezabřezlých ($n = 2$) byly rovněž zjištěny vyšší obsahy Zn v cervikálních hlenech ve srovnání se skupinou zabřezlých krav ($n = 5$) v této oblasti. Zdrojem kontaminace relativně čisté oblasti byl pravděpodobně dálkový přenos emisí a exhalátů Zn.

Vysoce statisticky průkazně ($P < 0,01$) se lišil antagonismus Zn : Cd u jalových a zabřezlých krav v exponované oblasti. Širší antagonismus ve skupině jalových krav z exponované oblasti (Zn : Cd = 52,71 : 1) ve srovnání s antagonismem výše uvedených prvků u zabřezlých krav ze stejné oblasti (Zn : Cd = 22,98 : 1) byl ovlivněn vysoce statisticky průkazně ($P < 0,01$) vyššími průměrnými obsahy Zn v cervikálních hlenech jalových krav z exponované oblasti (tab. IV). O negativním vlivu Zn na motilitu spermií referují práce autorů White (1955), Holland a White (1980) a Šimoník (1989). Výsledky šetření prokázaly, že Zn nemá jen esenciální funkci v organismu jak uvádí např. Underwood (1977), ale může negativně ovlivňovat úroveň koncepce skotu.

Z literárních citací, např. Rob (1985), White (1955), Holland a White (1980) lze předpokládat, že působení jednotlivých chemických prvků se musí v cervikálním hlenu počítat a proto jsme navrhli a hod-

notili „sumu chemických prvků“. Průměrná „suma chemických prvků“ v cervikálních hlenech jalových krav v exponované oblasti byla statisticky vysoce průkazně ($P < 0,01$) odlišná — vyšší ve srovnání s průměrnou „sumou chemických prvků“ v cervikálních hlenech zabřezlých krav exponované oblasti. Zn je prvek, který ovlivnil průměrné „sumy chemických prvků“ březích a jalových plemenic v cervikálních sekretech krav v exponované oblasti (tab. IV). Průměrná „suma chemických prvků“ v cervikálních sekretech krav v exponované oblasti ($n = 99$) a relativně čisté oblasti ($n = 7$) nebyla statisticky odlišná. Rovněž statisticky neprůkazné byly průměrné „sumy chemických prvků“ ve skupině zabřezlých krav ($n = 56$) v exponované oblasti ve srovnání s průměrnou „sumou chemických prvků“ zabřezlých krav z relativně čisté oblasti (tab. III, IV). Průměrná „suma chemických prvků“ v cervikálních hlenech pouze dvou jalových krav z neexponované oblasti byla vyšší než průměrná „suma chemických prvků“ v cervikálních hlenech nezabřezlých krav ($n = 43$) v exponované oblasti.

Z literárních údajů mnoha autorů (např. Potter aj., 1971) je prokázán kumulativní vliv chemických prvků v parenchymatózních orgánech skotu. V literárních citacích chybí údaje o závislosti obsahu chemických prvků v cervikálních hlenech krav na jejich věku. Výsledky šetření v tomto směru proti našemu očekávání prokázaly, že vylučování chemických prvků cervikálním hlenem nebylo ovlivněno jejich věkem. S rostoucím věkem krav nestoupal obsah chemických prvků v cervikálním hleně. To znamená, že adekvátní sekret děložního krčku vytváří srovnatelné prostředí pro motilitu spermií po celou dobu reprodukční periody plemence. Je-li však kontaminován chemickými prvky (Zn) dochází k narušení spermií a snížení koncepce. Lze vyslovit domněnku, že obsah chemických prvků v cervikálním hleně je pravděpodobně obrazem momentální kontaminace sliznice děložního cervixu, tedy místa tvorby cervikálního hleny v období říje skotu.

Z nálezů v tomto šetření lze dedukovat, že v rámci ČR je obtížné najít oblast bez vlivů emisí a exhalátů na plodnost skotu.

Literatura

- ANONYM: Analytical methods for Atomic Absorption Spectrophotometry, 303—0152, Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA, 1982.
- ANONYM: Návod k použití TMA 254, Trace Mercury Analyzátor, Tesla Holešovice, 1986, s. 33.
- BENCKO, V. — CIKRT, M. — LENER, J.: Toxické kovy v pracovním a životním prostředí člověka. Praha, Avicenum 1984, 264 s.
- CIBULKA, J.: Pohyb olova, kadmia a rtuti v zemědělské výrobě a biosféře. Praha, SZN 1986, 160 s.
- FINDEJSOVÁ, M. — HALAČKA, K. — NÁVRAT, K. — SPONAR, J. — ŠEFLOVÁ, A.: K problematice ovlivnění potravinového řetězce kadmii a olovem v průmyslových hnojivech. Českoslov. Hyg., 27, 1982, 8/9, s. 440—444.
- GAMČÍK, P. — SAKALA, J. — LOJDA, L.: Plodnost hovädzieho dobytku a jej poruchy. Bratislava, Príroda 1980, 497 s.
- HOLLAND, M. K. — WHITE, I. G.: Heavy metals and human spermatozoa. 1. Inhibition of the motility and metabolism of spermatozoa by metals related to copper. J. Fertil. and Steril., 34, 1980, č. 5, s. 483—489.
- HORSKÝ, J. — PRESL, J.: Gynekologická endokrinologie. Praha, Avicenum 1978, 556 s.
- HRUŠKA, K. — FRÁNEK, M. — BURSA, J. — KALÁB, P.: Radioimmunoassay of progesterone in cow milk. Endocrin. exp., 17, 1983a, s. 213—218.
- HRUŠKA, K. — VEŽNÍK, Z.: Significance of progesterone determination in milk. Endocrin. exp., 17, 1983b, s. 207—211.

- KUDLÁČ, E. — ELEČKO, J.: Veterinární porodnictví a gynekologie. Praha, SZN 1987.
- KÜHNERT, M.: Zur umwelttoxikologischen Belastung des Menschen durch Organo — Quecksilberverbindungen, insbesondere über die von Tieren stammenden Lebensmitteln. *Mh. Veter. Med.* (Praha), 28, 1983, č. 1, s. 5—11.
- POLÁŠEK, M. — ŘÍHA, J. — KVAPILÍK, J. — BANÁŠ, P.: Pomůcky pro detekci říje u plemenic skotu na pastvě a při volném ustájení. *Stud. Inform. ÚVTIZ Praha*, č. 2, 1985, s. 24.
- POTTER, G. D. — INTYRE, D. R. — VATTUONE, G. M.: The fate and implications of 203 Pb ingestion in a dairy cow and calf. *Health Phys.*, 20, 1971, s. 650.
- ROB, O.: Studium některých faktorů ovlivňujících reprodukci skotu. *Sbor. Vys. Šk. zeměd.*, Praha, 1985, s. 134.
- RŮŽIČKA, V.: Faktory negativně ovlivňující reprodukci skotu a ztráty telat. [Kandidátská disertace.] Praha 1986. 82 s. — Vysoká škola zemědělská.
- ŠIMONÍK, I.: Vliv toxických prvků na plodnost a některé pohlavní funkce skotu. [Kandidátská disertace.] Brno 1989. 113 s. — Vysoká škola veterinární.
- UNDERWOOD, E. J.: Trace elements in human and animal nutrition. New York and London, Acad. Press 1977, s. 679.
- WHITE, I.: The toxicity of heavy metals to mammalian spermatozoa. *J. Austral. exp. Biol.*, 33, 1985, s. 359.
- WUDL, L. R. — SHERMAN, M. I.: Effects of chemical in reproductive functions in mammals: Mechanism of cell injury and adaptive responses. In: YOUK, V. B. — SHERMAN, P. J.: 1983, s. 171—198.
- ŠIMONÍK, J. — KUDLÁČ, E.: Vztah spermiotoxicity cervikálního hlenu krav ke koncepci. *Veter. Med.* (Praha), 36, 1991, s. 129—134.

Došlo dne 13. 3. 1990

ŠIMONÍK, I. — PAVELKA, J. — KUDLÁČ, E. (District Veterinary Administration, Karviná; State Veterinary Institute, Ostrava-Martinov; University of Veterinary Medicine, Brno): *Chemical contamination of cervical mucus in cows in relation to conception and age.* *Veter. Med.* (Praha), 36, 1991 [4]: 193—202.

Applying the method of absorption atom spectrometry (AAS), the contamination of cervical mucus by chemical elements (Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, Zn) was demonstrated in the oestrus period of cows in different ecological agricultural regions of the North Moravian region. The results of observation revealed only a statistically significant difference ($P < 0.05$) in Cd contents in the test groups; test group $\bar{x} = 0.015 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Cd, control group $\bar{x} = 0.006 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Cr findings in cervical mucus are of priority importance, the same applies to Cu findings. Zinc was found to be an element influencing negatively the conception of cows. The Zn values in cervical mucus of nonpregnant cows were demonstrated to be significantly higher ($P < 0.01$) [conception — group = $0.841 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, conception + group = $0.219 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Zn. So called sum of chemical elements: Cd + Pb + Hg + Cr + Cu + Zn was proposed and evaluated as a picture of the total contamination of cervical mucus. This characteristic was also influenced by the Zn findings in the group of pregnant and nonpregnant cows. Zn: Cd antagonism in cervical secretions of barren and pregnant cows was statistically highly significant ($P < 0.01$). Chemical elements in cervical mucus were determined for the first time in a digested sample of cervical secretion. The correlation coefficients used for the cows ($n = 99$) from a contaminated region showed that the content of chemical elements in cervical secretion was not influenced by the age of cows. The content of chemical elements in cervical secretion was not increasing with the age.

cattle; cervical secretion; chemical elements Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, Zn; contaminated area; relatively uncontaminated area; conception; age

Adresy autorů:

MVDr. Ivo Šimoník, CSc., Okresní veterinární správa, Těšínská 619, 733 00 Karviná
Ing. Jiří Pavelka, CSc., Státní veterinární ústav, 723 08 Ostrava-Martinov
Prof. MVDr. Eduard Kudláč, CSc., Vysoká škola veterinární, Palackého 1—3, 612 42 Brno

DETEKCIA REZIDUÍ NIEKTORÝCH CUDZORODÝCH LÁTKO V TKANIVÁCH GENITÁLU BÝKOV A KRÁV A V SPERME BÝKOV

J. Feješ, I. Breyl, H. Šalitrošová

FEJEŠ, J. — BREYL, I. — ŠALITROŠOVÁ, H. [Štátny veterinárny ústav, Košice; Ústav zoohygieny a veterinárskej techniky, Košice]: *Detekcia reziduí niektorých cudzorodých látok v tkanivách genitálu býkov a kráv a v sperme býkov*. Veter. Med. [Praha], 36, 1991 (4): 203—211.

V dôsledku častých porúch reprodukcie v niektorých spoločných chovoch kráv, hlavne s priemyselným spôsobom prevádzky, pokúsili sme sa urobiť sondu na zistenie prítomnosti reziduí niektorých chemických cudzorodých látok v tkanivách genitálu kráv a býkov a v sperme plemenných býkov. Predpokladali sme možnosť negatívneho vplyvu týchto látok na reprodukčný proces kráv a býkov. Podľa názoru a údajov niektorých autorov v odbornej literatúre konštatuje sa skutočnosť, že sperma a tkanivá genitálu patria medzi biologické materiály, ktoré medzi prvými reagujú na toxické vplyvy rôznych chemických látok poruchami svojich fyziologických funkcií. Tieto poruchy, hlavne u spermálnych buniek, je možné objektívne posúdiť cez merateľné zmeny fyzikálnych a biologických vlastností. Zamerali sme sa na reziduá hexachlórbenzénu (HCB), α , β , γ izoméry hexachlórcyklohexanu,

Σ DDT a jeho metabolitov a polychlorovaných bifenyllov (PCB). Zistené hodnoty reziduí týchto látok vo vyšetrovaných biologických materiáloch boli veľmi nízke, prípadne sme ich vôbec nezistili. Predpokladáme, že nemohli významnejšie ovplyvniť fyziologickú funkciu vyšetrovaných kráv a býkov so zreteľom na ich reprodukčné orgány. Ukazuje sa potreba rozšírenia a prehĺbenia takéhoto vyšetrení, obzvlášť v chovoch a oblastiach ekologicky ohrozených, so zameraním sa na vyšetrovanie reziduí aktuálnych cudzorodých látok z hľadiska ekologických pomerov. Aktuálnosť tejto požiadavky je podporená aj údajmi v odbornej literatúre, že boli zistené a dokázané prípady negatívneho vplyvu niektorých cudzorodých látok (PCB) na reprodukčné funkcie ľudí a hospodárskych zvierat. Výsledky našich sledovaní považujeme za jeden z prvých dotykov s uvedenou problematikou v našich podmienkach. Považujeme za užitočné prehlbovanie, rozpracovanie a upresnenie diagnostických postupov vzhľadom na neutešené ekologické problémy aj v tejto oblasti.

skot; pohlavné orgány; cudzorodé látky; rezidua

Široké uplatňovanie rôznych chemických látok, pesticídov, herbicídov, umelých hnojív, liečiv a iných v poľnohospodárskej výrobe, dáva značné možnosti ku perzistencii reziduí týchto látok v rastlinných kultúrach, v organizme hospodárskych zvierat a v potravinovom reťazci.

Malík (1981) udáva, že čs. poľnohospodárstvo zaujíma jedno z popredných miest vo svete pri spotrebe rôznych chemických látok. Rob (1986) konštatuje, že v čs. poľnohospodárstve sa využívalo a súčasne využíva až 550 druhov herbicídov, pesticídov, insekticídov a exfoliantov.

Tieto látky sa kumulujú v pôde, vo vode, v živých organizmoch a dostávajú sa až do buniek jednotlivých tkanív. Ich odbúravanie z organizmu prebieha v rôznom časovom období, zhruba od 3 týždňov až do 30 mesiacov. Na 1 m² poľnohospodárskej pôdy v niektorých okresoch boli namerané hodnoty až 6 mg rôznych cudzorodých látok. Ohrozené sú aj povrchové, aj spodné vody.

Rob (1986) — cit. Dixon a Lee, 1980; Mann a Lutwak-Mann, (1981) poukazuje na možnosť negatívnych účinkov týchto chemikálií aj na reprodukčné funkcie hospodárskych zvierat. Pri samcoch sa to môže prejavovať negatívnym pôsobením na semenníky, prisemenníky a prídavné pohlavné žlázy, alebo ovplyvnením riadiacej osi hypotalamus-hypofýza-gonády. Autor obzvlášť poukazuje na polychlorované bifenyly (PCB), ktoré vznikajú pri výrobe plastických hmôt, sú súčasťou mazadiel a syntetických vlákien a veľmi ľahko prenikajú do organizmov cicavcov.

Ahmed a i. (1977) dokazujú negatívny vplyv chlorovaných uhľovodíkov na spermiogézu lenghorských kohútov a nasledovné zníženie oplodnenosti sliepok a liahnivosti kurčiat. Dibromchlórpropan (DBCP), ktorý sa používa v poľnohospodárstve proti niektorým škodlivým nematódam, vyvolal pri zasiahnutých robotníkoch, ktorí ho aplikovali, oligospermiu a azospermiu (Whorton, 1979; Whorton a Milby, 1980). Aj Potashnik a i. (1979), Glass a Lynn (1979) zistili pri aplikátoroch pesticídov korelácie medzi poklesom počtu spermií v ejakulátoch a manipuláciami s týmito chemickými látkami. V testikulárnych biopsiách týchto mužov boli zisťované atrofie germinálneho epitelu semenníkov a intaktnosť Sertoliho a Leydigových buniek. V spermiograme sa to vyznačovalo oligospermiou a azospermiou. Najvýraznejší účinok v tomto smere vykazoval dibromchlórpropan.

Toxikanty, vrátane polychlorovaných bifenylov, dibromchlórpropanu a dusitanov vyvolávajú reprodukčné poruchy pri vtákoch. Potvrdili to Kosutsky a i. (1979), Call a Harrell (1974), McLane a Hughes (1980), Cecil a i. (1980), Busch a i. (1974). Negatívny vplyv týchto cudzorodých látok na poruchy reprodukcie pri norkách a fretkách potvrdil Bleavius a i. (1980) a pri potkanoch Sager (1983).

MATERIÁL A METÓDY

Zamerali sme sa na detekciu reziduí niektorých frekventovaných chemických látok, a to u sperme plemenných býkov a v tkanivách genitálu býkov a kráv. Mali sme na zreteli možnosti negatívneho vplyvu na biologickú kvalitu spermy býkov a na ostatné reprodukčné funkcie genitálu hovädzieho dobytká. Viedli nás k tomu dosť časté prípady porúch reprodukcie a znižovanie plodnosti kráv, obzvlášť vo veľkokapacitných podmienkach chovu.

Vzorky natívnej spermy býkov, pohlavné orgány odporazených býkov a kráv boli zasielané z plemenárskej stanice M. a z vybraných jatočných zvierat odporazených na bitúnku K. Vzorky boli odoberané podľa našich požiadaviek veterinárskymi andrológami OVS a zasielané na oddelenie reprodukcie a RP pre cudzorodé látky v potravinách a krmivách ŠVÚ Košice.

Hodnoty reziduí cudzorodých látok v týchto biologických materiáloch boli robené metódou plynovej chromatografie s detektorom elektrónového záchytu. Purifikácia extraktov pre plynovú chromatografiu bola realizovaná metódou kyslej hydrolyzy lipofilných materiálov s následujúcou extrakciou do petroléru. Táto screeningová metóda umožňuje dokázať reziduá 0,01 mg.kg⁻¹ tuku.

Vo vyšetrovaných biologických materiáloch a v pomocných porovnávacích vzorkách sme zisťovali hodnoty reziduí týchto chemických látok:

— HCB — hexachlórbenzén — ktorý donedávna bol súčasťou moridiel obilia.
 — Gama-HCl — gama izomér hexachlórčyklohexanu (tov. zn. Lindan), ktorý sa používa ako moridlo obilia a ku dezinfekcii pôdy proti hädátkam.
 — Alfa a beta-HCH — alfa a beta izoméry hexachlórčyklohexanu, ktoré vznikajú ako kontaminanty pri výrobe Lindanu.
 — Σ DDT a jeho metabolity p,p-DDE, p,p-DDD, o,p'-DDT a p,p'-DDT, ktoré vznikajú pri biologickej degradácii Σ DDT a ukladajú sa v tkanivách živých organizmov. DDT sa od roku 1974 v poľnohospodárskej výrobe nepoužíva. Jeho zbytky môžu sa objavovať v rastlinolekárstve, prípadne v starých nekontrolovateľných zásobach. Pretrvávanie v organizme je veľmi dlhé, z dôvodov značne zdĺhavého rozpadu tejto chemickej látky.
 — PCB — polychlorovaný bifenyl, ktorý býva súčasťou širokej palety rôznych výrobkov. Je súčasťou dielektrikumu v kondenzátoroch, nachádza sa v olejových kvapalinách v transformátoroch, ale hlavne bol súčasťou mazadiel a farieb. Tieto sa používali na nátery aj v potravinárskom a krmivárskom priemysle. Rovnako sa používali na nátery v poľnohospodárstve (nátery silážnych veží). Táto chemická látka má vyše 200 izomérov, z ktorých niektoré môžu pôsobiť ako promótor karcinogenného pôsobenia niektorých iných zlúčenín a látok. Niektoré izoméry sú relatívne neškodné.
 Reziduá popísaných chemických cudzorodých látok sme zisťovali v nasledovných biologických materiáloch: natívne sperma býkov, semenníky, prisemenníky, mechúrikovité žľazy (*vesiculae seminales*) býkov, vaječníky kráv, krv býkov a ľadvinový tuk býkov.

VÝSLEDKY

V prvej sérii vyšetroaní sme sa zamerali na obsah reziduí sledovaných cudzorodých látok v tkanivách genitálu a v ľadvinovom tuku vybraných jatočných zvierat. Išlo o jatočné výkrmové býky vo veku 13—15 mesiacov a jatočné kravy, vyradené pre poruchy reprodukcie, ktoré boli vo veku 3—11 rokov. Zvieratá pochádzali z niekoľkých chovov okresov T. a K. Jednalo sa väčšinou o krížencov slovenského strakatého a čierno-strakatého nížinného plemena (tab. I, II).

Výsledky vyšetroaní z biologického materiálu od plemenných býkov pochádzali od zvierat z plemenárskej stanice M. Jednalo sa o plemenných býkov v inseminácii vo veku od 3—7 rokov. Išlo o býkov bez zjavných porúch spermiogenézy, ale aj o býkov s ľahšími a hlbšími poruchami spermiogenézy a s produkciou biologicky menej hodnotnej spermy, ktorá vykazovala zníženú fertilizačnú kapacitu. Spermiologický náález vykazoval najčastejšie zníženie motility spermií, zhoršenie ich prežiteľnosti a zmraziteľnosti (tab. III).

V ďalšej skupine 7 plemenných býkov z plemenárskej stanice P. CH. sme zisťovali a hodnotili reziduá sledovaných cudzorodých látok z dôvodov, že sa jednalo o plemenársku stanicu, na ktorej až 60 % ustajnených býkov vykazovalo dlhodobé poruchy spermiogenézy (nízka motilita spermií, znížená prežiteľnosť a zlá zmraziteľnosť). Býci neprojavovali žiadne klinické príznaky ochorenia (tab. IV).

DISKUSIA

Snažili sme sa osvetliť význam niektorých netradičných faktorov a ich možný negatívny vplyv na poruchy reprodukcie hovädzieho dobytku v našich podmienkach. Sledovali sme preto prítomnosť reziduí niektorých chemických cudzorodých látok v sperme býkov, v tkanivách genitálu býkov a kráv a v niektorých pomocných orientačných vzorkách (ľadvinový tuk, krv). Celkom sme vyšetrili 15 semenníkov, 5 prisemenníkov a 10 vzoriek tuku jatočných býkov, 5 vaječníkov vyradených kráv, 7 vzoriek natívnej spermy, 11 semenníkov, 8 prisemenníkov, 11 mechúrikovitých prídavných pohlavných žliaz, 3 vzorky ľadvinového tuku a 7 vzoriek krve plemenných býkov. Dohromady sme vyšetrili 82 rôznych vzoriek.

Z výsledkov konštatujeme, že niektoré chemické látky, a to polychlorované bifenylly (PCB) a beta-izoméry hexachlórkyklohexanu (v tabulkách nie je uvedený) neboli zistené v podobe reziduí v žiadnej z vyšetrených vzoriek.

I. Jatoční býci — Slaughter bulls

Číslo vzorky ¹	Číslo skupiny ²	Materiál ³	Obsah reziduí vo vyšetřovanom materiále ⁴ [mg . kg ⁻¹]						
			HCB	γ-HCH	α-HCH	DDE	DDD	ΣDDT	PCB
1	I	semenník ⁵	0,005	0,016	0,012	0	0,001	0,001	0
		prisemenník ⁶	0	0,001	0,006	0	0,010	0,010	0
2	I	semenník ⁵	0,009	0,012	0,013	0	0,010	0,010	0
		prisemenník ⁶	0,007	0,012	0,004	0	0	0	0
3	I	semenník ⁵	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0
		prisemenník ⁶	0	0,006	0,009	0	0	0	0
4	I	semenník ⁵	0	0,001	0,002	0	0	0	0
		prisemenník ⁶	0	0,002	0,012	0	0	0	0
5	I	semenník ⁵	0	0,003	0,002	0	0	0	0
		prisemenník ⁶	0	0,005	0,004	0	0,001	0,001	0
6	II	semenník ⁵	0,800	0,610	0,360	0	0	0	0
		tuk ľadvinový ⁷	0,004	0,060	0,030	0,14	0	0,140	0
7	II	semenník ⁵	0,130	0	0,130	0	0	0	0
		tuk ľadvinový ⁷	1,470	0	1,140	1,71	0	1,710	0
8	II	semenník ⁵	0	0	0,250	0	0	0	0
		tuk ľadvinový ⁷	0,510	0	0,130	0,39	0	0,390	0
9	II	semenník ⁵	0	0	0	0	0	0	0
		tuk ľadvinový ⁷	0,310	0	0,270	1,53	0	1,530	0
10	II	semenník ⁵	0	0	0	0	0	0	0
		tuk ľadvinový ⁷	1,410	0	0,400	4,45	0	4,450	0
11	II	semenník ⁵	0	0	0	0	0	0	0
		tuk ľadvinový ⁷	0,740	0	0,040	4,89	4,470	9,360	0
12	II	semenník ⁵	0,001	0	0,110	0	0	0	0
		tuk ľadvinový ⁷	0,300	0	0,110	0,11	0	0,110	0
13	II	semenník ⁵	0	0	0	0	0	0	0
		tuk ľadvinový ⁷	0,070	0	0,050	0	0	0	0
14	II	semenník ⁵	0	0	0	0	0	0	0
		tuk ľadvinový ⁷	0,370	0	0,220	0,70	0	0,700	0
15	II	semenník ⁵	0,001	0	0	0	0	0	0
		tuk ľadvinový ⁷	0	0	0	0	0	0	0

¹sample number, ²group number, ³material, ⁴content of residues in examined material, ⁵testis, ⁶epididymis, ⁷kidney fat

II. Jatočné kravy — Slaughter cows

Číslo vzorky ¹	Číslo skupiny ²	Vek [r.] ³	Materiál ⁴	Obsah reziduí vo vyšetřovanom materiále ⁵ [mg.kg ⁻¹]						
				HCB	γ-HCH	α-HCH	DDE	DDD	Σ DDT	PCB
1	III	3	vaječník ⁶	0,001	0,002	0,003	0	0	0	0
2	III	4	vaječník ⁶	0	0,130	0,012	0	0	0	0
3	III	5	vaječník ⁶	0,012	0,010	0,006	0	0	0	0
4	III	10	vaječník ⁶	0,015	0,036	0,047	0,01	0	0,01	0
5	III	11	vaječník ⁶	0	0,015	0,014	0	0	0	0

For 1—2 see Tab. I; ³age (years), ⁴material, ⁵content of residues in the examined material, ⁶ovary

III. Plemenní býci — Sires

Býk ¹	Vek [r.] ²	Klinický a patologicko-anatomický náález na genitáli ³	Materiál ⁴	Obsah reziduí vo vyšetřovanom materiáli ⁵ [mg . kg ⁻¹]						
				HCB	γ-HCH	α-HCH	DDE	DDD	Σ DDT	PCB
GU-24	5	porucha spermio-genézy ⁶	semenník ⁸	0,010	0,050	0	0	0	0	0
			mechúrikové žľazy ⁹	0	0,004	0	0	0	0	0
			tuk ľadvinový ¹⁰	0,006	0,003	0,380	0,380	0	0	0
CE-13	5	porucha spermio-genézy ⁶	semenník ⁸	0,005	0,029	0	0,055	0	0	0
			mechúrikové žľazy ⁹	0,010	0,003	0	0	0	0	0
			tuk ľadvinový ¹⁰	0,040	0,031	0	0,384	0	0	0
LG-13	6	bez patologického nálezu ⁷	semenník ⁸	0,010	0,010	0	0	0	0	0
			mechúrikové žľazy ⁹	0	0,010	0	0	0	0	0
			tuk ľadvinový ¹⁰	0,005	0,001	0	0,120	0	0,1	0
HX-23	4	bez patologického nálezu ⁷	semenník ⁸	0,010	0	0	0	0	0	0
			prisemenník ¹¹	0	0,010	0	0	0	0	0
			mechúrikové žľazy ⁹	0,010	0	0	0	0	0	0

Býk ¹	Vek [r.] ²	Klinický a patologicko- anatomický nález na genitálii ³	Materiál ⁴	Obsah reziduí vo vyšetrovanom materiáli ⁵ [mg . kg ⁻¹]						
				HCB	γ -HCH	α -HCH	DDE	DDD	Σ DDT	PCB
GI-4	4	porucha spermio- genézy ⁶	semenník ⁸	0,010	0,010	0	0	0	0	0
			prisemen- ník ¹¹	0	0,010	0	0	0	0	0
			mechúriko- vé žľazy ⁹	0	0,010	0	0	0	0	0
MJR- -5	3	porucha spermio- genézy ⁶	semenník ⁸	0,010	0,010	0,010	0	0	0	0
			prisemen- ník ¹¹	0	0	0	0	0	0	0
			mechúriko- vé žľazy ⁹	0	0	0	0	0	0	0
LG-7	4	bez pato- logického nálezu ⁷	semenník ⁸	0	0,010	0,010	0	0	0	0
			prisemen- ník ¹¹	0	0	0	0	0	0	0
			mechúriko- vé žľazy ⁹	0,020	0,010	0,010	0	0	0	0
GU-23	4	bez pato- logického nálezu ⁷	semenník ⁸	0	0	0	0	0	0	0
			prisemen- ník ¹¹	0	0,010	0	0	0	0	0
			mechúriko- vé žľazy ⁹	0,002	0,010	0,001	0	0	0	0
ZU-3	4	porucha spermio- genézy ⁶	semenník ⁸	0	0,010	0,003	0	0	0	0
			prisemen- ník ¹¹	0	0,020	0,002	0	0	0	0
			mechúriko- vé žľazy ⁹	0,001	0,020	0,010	0	0	0	0
AL-4	5	bez pato- logického nálezu ⁷	semenník ⁸	0	0,010	0,002	0	0	0	0
			prisemen- ník ¹¹	0	0,010	0	0	0	0	0
			mechúriko- vé žľazy ⁹	0,005	0,003	0,002	0	0	0	0
LR-6	5	bez pato- logického nálezu ⁷	semenník ⁸	0	0,001	0	0	0	0	0
			prisemen- ník ¹¹	0	0,006	0	0	0	0	0
			mechúriko- vé žľazy ⁹	0,003	0,002	0,001	0	0	0	0

¹sire, ²age (years), ³clinical and patho-anatomic finding in the genitals, ⁴material, ⁵content of residues in the examined material, ⁶spermiogenesis disorder, ⁷no pathological finding, ⁸testis, ⁹follicular glands, ¹⁰kidney fat, ¹¹epididymis

vaných vzoriek. Aj reziduá pri ostatných vyšetrovaných chemických látkach boli v materiáloch v nízkych, toxikologicky nevýznamných hodnotách alebo sa nenachádzali vôbec. Vyššie hodnoty sme zaznamenali pri Σ DDT v ľadvinovom tuku niektorých jatočných býčkov.

Pretože v dostupnej odbornej literatúre sme nenarazili na prípustné normy reziduí sledovaných cudzorodých látok v sperme a v tkanivách genitálu hovädzieho dobytká, prípadne iných hospodárskych zvierat,

Býk ¹	Materiál ²	Obsah reziduí vo vyšetřovanom materiáli ³ [mg . kg ⁻¹]						
		HCB	γ-HCH	α-HCH	DDE	DDD	ΣDDT	PCB
SM-25	natívne sperma ⁴	0,001	0,001	0	0	0	0	0
	krv ⁵	0	0	0	0	0	0	0
MX-44	natívne sperma ⁴	0,001	0	0	0	0	0	0
	krv ⁵	0	0	0	0	0	0	0
PO-15	natívne sperma ⁴	0	0,001	0	0	0	0	0
	krv ⁵	0	0	0	0	0	0	0
AGK-52	natívne sperma ⁴	0,020	0,001	0,001	0	0	0	0
	krv ⁵	0	0,001	0,001	0	0	0	0
AT-24	natívne sperma ⁴	0,010	0	0	0	0	0	0
	krv ⁵	0	0	0	0	0	0	0
PO-17	natívne sperma ⁴	0,001	0	0	0	0	0	0
	krv ⁵	0	0	0	0	0	0	0
AT-27	natívne sperma ⁴	0,010	0	0	0	0	0	0
	krv ⁵	0,010	0	0	0	0	0	0

¹bull, ²material, ³content of residues in the examined material, ⁴native sperm, ⁵blood

uvádzame pre porovnanie niektoré normatívne hodnoty, ktoré sú prípustné pre niektoré iné tkanivá a materiály živočíšneho pôvodu, ako to uvádza Vyhláška 35/1977 hlavného hygienika SR a niektoré navrhované normy: — HCB-hexachlórbenzén — prípustná norma v mlieku 0,5 mg . kg⁻¹ mliečného tuku. U h n á k a i. (1975) vo vyšetřovaných vzorkách mlieka kráv v SR zaznamenávali hodnoty od 0,07—0,2 mg . kg⁻¹.

— Gama HCH (gama-hexachlór-cyklohexan-Lindan) — prípustná norma v mlieku kráv 0,2 mg . kg⁻¹ mliečného tuku, prípustná norma vo vajíčku bez škrupiny 0,1 mg . kg⁻¹. Izomér alfa-HCH v tab. I pri niektorých vyšetřovaných materiáloch vykazoval vyššie hodnoty ako izomér gama-HCH, čo svedčí o známej skutočnosti, že alfa-izomér sa v organizme kumuluje, zatiaľ čo gama-izomér sa z organizmu vylučuje pomerne rýchlo.

— Σ DDT-normou prípustná hodnota v mlieku kráv je 0,4 mg . kg⁻¹ mliečného tuku, vo vajíčku bez škrupiny 0,5 mg . kg⁻¹. V našich vyšetřeniach v ľadvinovom tuku piatich jatočných býkov sme zistili vyššie hodnoty od 0,7—9,36 mg . kg⁻¹. Zo zaujímavejších stredných hodnôt z humánnej medicíny uvádza Rosival a i. (1980): Σ DDT v uteru žien v SR 0,086—0,119, v placentе žien 0,07—0,36, v embryách človeka 0,108, v krvi gravidných žien 0,036, v tuku gravidných žien 4,41 mg . kg⁻¹. Pokiaľ sa týka gama-HCH (Lindan) zisťoval tento autor nasledovné stredné hodnoty reziduí: krv žien 0,18, placenta 0,018, tuk gravidných žien 0,018 mg . kg⁻¹.

PCB nie je predmetom spomínanej vyhlášky. Rozhodnutie hlavného hygienika ČR z 31. 1. 1990 dovoľuje najvyššie prípustné normy reziduí PCB v kravskom mlieku 0,3 mg . kg⁻¹ mliečného tuku, pri bravčovom

mäse a tuku je to 0,7 a pri hovädzom mäse a loji 1,5 mg . kg⁻¹. UHNÁK (1980) udáva, že pri svojich sledovaniach nezistoval žiadne reziduá PCB v mlieku kráv z vyšetrovaných chovov na Slovensku.

Z uvedených výsledkov nemôžeme jednoznačne konštatovať, že by zistené hodnoty reziduí niektorých sledovaných chemických látok v sperme býkov a v tkanivách genitálu býkov a kráv, nemohli negatívne ovplyvňovať reprodukčné funkcie týchto zvierat, pretože v našich podmienkach nemohli sme nami dosiahnuté výsledky podrobiť porovnaniu v kontrolnej skupine zvierat. Možný negatívny vplyv týchto látok potvrdzuje BUSCH a i. (1986), ktorí vyšetrili 170 ejakulátov plodných mužov, mužov s idiopatickou oligospermiou alebo azoospermiou, prípadne po vazektómii. Zachytili a analyzovali vo vzorkách spermy 74 izomérov polychlorovaných bifenylov, Σ DDT a hexachlórbenzénu. Nálezy niektorých izomérov polychlorovaných bifenylov boli v korelácii s poklesom motility a s poklesom koncentrácie spermií vo vyšetrovaných vzorkách a znižovali ich biologickú a fertilizačnú kvalitu.

Z uvedeného vyplýva, že sice naše výsledky dali hrubý obraz o prítomnosti reziduí v sperme a genitále vyšetrovaných býkov a kráv pri sledovaných chemických látkach, ale taktiež možno vyvodit', že v budúcnosti bude dôležité zamerať sa pri vyšetreniach na určité chemické látky a ich reziduá s možným negatívnym vplyvom na reprodukčné orgány samcov a samic hospodárskych zvierat.

Literatúra

- AHMED, T. — ARSCOTT, G. H. — TINSLEY, L. J.: Effect of chlorinated hydrocarbons on reproductive performance of adult White Leghorn male chickens. *Poult. Sci.*, 56, 1977, s. 1692.
- BLAEVIUS, M. H. — AULERICH, R. J. — BLAEVIUS, M. R. — RINGER, P. R.: Polychlorinated biphenyls (Aroclor 1016 and 1242). Effects of survival and reproduction in minks and ferrets. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 9, 1980, s. 627.
- BUSCH, B. — BENNET, A. H. — SNOW, J. T.: Polychlorobiphenyl congeners P'-p'-DDE and sperm function in humans. *Archiv. Environ. Contam. Toxicol.*, 15, 1986, s. 333—341.
- BUSCH, B. — TUMASONIC, C. F. — BAKER, R. D.: Toxicity and persistence of PCB homologs and isomers in the avian systems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2, 1974, s. 195—209.
- CALL, D. J. — HARRELL, B. E.: Effects of dieldrin and polychlorinated biphenyls upon the production and morphology of Japanese quail eggs. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 11, 1974, s. 70.
- CECIL a kol.: Embryotoxic and teratogenic effects in unhatched fertile eggs from heus fed polychlorinated biphenyls. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 11, 1974, s. 489.
- GLASS, R. I. — LYNN, R. N.: Sperm count depression in pesticide applicators exposed to DBCP. *Amer. Epidem.*, 109, 1979, s. 336.
- KOSUTSKÝ, J. — ADAMEC, J. — BOBÁKOVÁ, E.: Effects of polychlorinated biphenyls in poultry reproduction. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 21, 1979, s. 737.
- MALÍK, J.: Zásady a legislatívne opatrenie pre povolovanie a používanie cudzorodých látok v požívatinách. In: Zbor. Cudzorodé látky v požívatinách, 1981, s. 107.
- McLANE, M. A. R. — HUGHES, D. L.: Reproductive success of screech owls fed Aroclor 1248. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 9, 1980, s. 661.
- POTASCHNIK, G. — YANI-INBAR SACKS, M. I. — ISRAELI, R.: Effects of DBCP on human testicular function. *Israel J. Med. Sci.*, 15, 1979, s. 438.
- ROB, O.: Vliv některých toxikologicko-ekologických faktorů na reprodukci a zdraví hospodářských zvířat. *Stud. Inform. ÚVTIZ*, 1986, č. 2, s. 14—15.
- ROSIVAL, L. — SZOKOLAY, A. — GRUNT, J.: *Lekársky Obzor* 1980, s. 67.
- SAGER, D. B.: Effects of potential exposure to PCB on adult male reproductive function. *Environ. Res.*, 31, 1983, s. 76—94.
- UHNÁK, J.: Pesticídy a priemyselné chemikálie v životnom prostredí. [Záverečná správa.] Bratislava, VÚPL 1980.

UHNÁK, J.: Ekochémia reziduí hexachlórbenzénu. In: Zbor. Cudzorodé látky v požívateľných. 1981, s. 88.
 UHNÁK, J. — SZOKOLAY, A. — SACKMAUEROVÁ, M.: Zbor. Ref. — Konferencia hygienikov výživy, 2.—4. 7., Plzeň, 1975.
 WHORTON, D. a kol.: testicular funktion in DBCP exposed workers. J. Occup. Med., 21, 1979, s. 21, 161.
 WHORTON, D. — MILBY, T. H.: Recovery of testicular funktion among DBCP workers. J. Occup. Med., 22, 1980, s. 177.

Došlo dňa 26. 4. 1990

FEJEŠ, J. — BREYL, I. — ŠALITROŠOVÁ, H. (State Veterinary Institute, Košice; Institute of Zoo — hygiene and Veterinary Technique, Košice): *Detection of residues of some foreign substances in the tissues of bull and cow genitals and in bull sperm.* Veter. Med. [Praha], 36, 1991 (4): 203—211.

The presence of residues of some chemical foreign substances in the tissues of cow and bull genitals and in sire sperm was investigated due to frequently occurring reproductive disorders in some large cow herds, mainly with the large-scale rearing system. Negative effects of these substances on the reproductive process of cows and bulls were supposed to be exerted. In keeping with the opinions and data mentioned by some authors in the literature there is a fact that the sperm and tissues of genitals belong to those biological materials which are the first to respond to the toxic effects of different chemicals by disorders of their physiological functions. These disorders, mainly in sperm cells, can be evaluated objectively from the recorded changes in physical and biological characteristics. The chemicals under investigation were residues of hexachlorobenzene (HCB), α , β , γ hexachlorocyclohexane isomers, Σ DDT and its metabolites and of polychlorinated biphenyls (PCB). The concentrations of the residues of these substances in the examined biological materials were very low, in some cases they were not detected at all. It is therefore supposed that these residues could not exert and significant effects on the physiological functions of examined cows and bulls with respect to their reproductive organs. These examinations should become more extensive and thorough, mainly in the herds and regions exposed to potential contamination; the residues of foreign substances should be investigated in view of ecological conditions. These postulates are very urgent, as illustrated by the literature data: in some cases negative effects of certain foreign substances (PCB) were found out and demonstrated on the reproductive functions of people and farm animals. The results of our investigations can be taken as the first contacts with the given problems in Czechoslovak conditions. It will be useful to formulate, elaborate and specify diagnostic procedures aiming at a solution of pressing ecological problems in this sphere.

cattle; sex organs; foreign substances; residues

Adresy autorov:

MVDr. Ján Feješ, RNDr. Helena Šalित्रोšová, Štátny veterinárny ústav, Dukelských hrdinov 1, 040 01 Košice
 RNDr. Ivo Breyll, Ústav zoohygieny a veterinárnej techniky, Dukelských hrdinov 1, 040 01 Košice

Upozornění pro přispěvatele a čtenáře časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Pro lepší zpřístupnění výsledků československého výzkumu zahraničním odběratelům rozhodla redakční rada časopisu VETERINÁRNÍ MEDICÍNA počínaje ročníkem 1991 uveřejňovat rozšířené, podrobně zpracované (s odkazy na tabulky a obrázky) souhrny v angličtině. Od ročníku 1992 budou tyto souhrny podmínkou pro přijetí příspěvků do tisku.

Proto žádáme autory našeho časopisu, aby příspěvky zasílané do redakce vybavili kratším souhrnem, který bude publikován v češtině či slovenštině, a dále delším souhrnem (v rozsahu do dvou rukopisných stran), který bude přeložen do angličtiny.

Doufáme, že se toto opatření setká s příznivým ohlasem jak u autorů, tak i u čtenářů našeho časopisu.

Redakce časopisu

ÚČINNOST VYBRANÝCH ANTIBIOTIK NA MIKROORGANISMY KONTAMINUJÍCÍ EJAKULÁTY KANCŮ

J. Mazurová, P. Vinter

MAZUROVÁ, J. — VINTER, P. [Státní veterinární ústav, Pardubice; Výzkumný ústav pro chov prasat, Kostelec nad Orlicí]: *Účinnost vybraných antibiotik na mikroorganismy kontaminující ejakuláty kanců*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (4): 213—223.

Ve dvou etapách jsme sledovali výskyt mikroorganismů, včetně jejich celkových počtů v nativních ejakulátech kanců a dále ovlivnění zjištěné kontaminace po naředění spermatu ředidly obsahujícími jednotlivá antibiotika: ampicilin, gentamycin, apramycin, cefoxitin nebo kombinace antibiotik: penicilinu se streptomycinem, ampicilinu s cefoxitinem, gentamycinu s cefoxitinem a ampicilinu s gentamycinem. Zastoupení bakteriálních druhů a celkové počty mikrobů v 1 ml ředěného spermatu, uchovávaného při teplotě přibližně 18 °C jsme zjišťovali za 24, 48 a 72 h po naředění. Ze všech nativních ejakulátů jsme vykultivovali mikroorganismy. Mezi nejfrekventovanější patřily *Proteus sp.* (63,3 %) a *Pseudomonas aeruginosa* (51,5 % z celkem vyšetřených vzorků). Počty kontaminovaných ředěných ejakulátů se pohybovaly za 24 h po naředění od 12,5 do 95,8 %, za 48 h od 12,5 do 98,5 procenta a za 72 hod 16,8 do 95,8 % z celkem vyšetřených. Výskyt mikroorganismů většinou koreloval se spektrem účinnosti obsažených antibiotik nebo jejich kombinací. Průměrné počty mikroorganismů v 1 ml nativního ejakulátu dosahovaly v I. etapě 2 363 000, ve II. etapě 1 472 108. Nejvyšší průměrné počty v 1 ml ředěného spermatu byly zaznamenány v ejakulátech obsahujících cefoxitin a apramycin. Z antibiotik přidávaných jednotlivě byl nejúčinnější gentamycin [průměrný počet mikroorganismů — CPM v 1 ml byl 416 za 24 h, 955 za 48 h a 2260 za 72 h po naředění], z kombinací byla nejvhodnější ampicilin s gentamycinem (14—20—21). Tato kombinace vykazovala velmi dobrou účinnost i na *Proteus sp.* a *Pseudomonas aeruginosa*.

kanec; ejakulát; sperma; mikrofóra; kontaminace; antibiotika; dekontaminace

Jedním z významných činitelů negativně ovlivňujících biologickou kvalitu spermatu jsou mikroorganismy, které pronikají do ejakulátu při jeho odběru i dalším zpracování v různém kvalitativním i kvantitativním zastoupení. Podmínky potřebné k uchovávání kančího spermatu do doby inseminace umožňují jejich další pomnožení v optimálním prostředí semenné plazmy. Škodlivé účinky mikrobů na spermie se uplatňují zejména prostřednictvím toxinů, produktů metabolismu a také úbytkem energetických zdrojů z plazmy, což má za následek snížení přežitelnosti i vlastní oplozovací schopnosti spermií. Mikroorganismy přenesené kontaminovaným spermatem do dělohy se mohou dále podílet na vzniku patologických procesů různého charakteru.

PŘEHLED LITERATURY

Ve většině získaných ejakulátů kančů byly mikroorganismy prokázány. Nejčastěji se vyskytovaly *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Proteus* sp., stafylokoky, streptokoky, korynebaktérie, aerobní sporulující bakterie a další, zejména gramnegativní mikroorganismy, včetně spór hub. Celkové počty živých bakteriálních buněk se pohybovaly od několika desítek do několika milionů v 1 ml spermatu [Aamdal aj., 1958; Sachno a Sinjajeva, 1962; Lingam a Campbell, 1965; Busch aj., 1969; Kozumplík a Vlček, 1970; Kozumplík, 1975; Gamčík a Nemeš, 1981; Sone aj., 1982; Moroz a Makucha, 1986; Weitz a Rath, 1987; Feješ aj., 1989].

Výskyt mikrobů v ejakulátech se dále mění v průběhu skladování, přičemž významný je jejich počáteční obsah, doba a zejména teplota, při které je sperma uchováno.

Heidrich aj. (1964) sledovali množení bakterií v ejakulátech při teplotě 15 °C. Počet živých bakteriálních buněk stoupal a devátý den dosahoval 122 až 291 milionů v 1 ml. Rovněž Busch aj. (1969) prokázali pomnožování mikrobů ve spermatu uchovávaném při pokojové teplotě. V prostředí chladničky bylo pomalejší a mnohdy docházelo i ke snížení jejich počtu.

Zvláště vysoká citlivost kančích spermií vůči chladu však vyžaduje skladovací teploty nad 15 °C, což umožňuje pomnožování většiny mikroorganismů vyskytujících se v ejakulátech [Kozumplík a Vlček, 1973; Weitz a Rath, 1987].

Negativní vlivy některých bakteriálních druhů byly studovány zejména na spermích byků. Pokusy prováděné Krolinským (1977) prokázaly nepříznivý vliv *P. aeruginosa* na přežitelnost spermií. Intenzita účinku byla přímo úměrná počtu bakteriálních buněk v ejakulátu. Zkrácení doby přežitelnosti bylo způsobeno toxiny, produkovanými při výměně látkové a uvolněním z buněk po jejich odumření. Po 60minutové inkubaci ejakulátů obsahujících 3 milióny bakteriálních buněk v 1 ml při teplotě 37 °C zjistil Boryczko (1982) výrazný pokles obsahu živých spermií vůči nekontaminované kontrole, a to ve vzorcích s *P. aeruginosa* o 6,9 %, *E. coli* o 6,9 % a *Staphylococcus aureus* o 9,7 %. Toxický vliv produktů metabolismu *S. aureus* se projevovat ztrátou motility a akrozómu [Mayer, 1980]. Snížení motility následkem poklesu pH při silné mikrobiální kontaminaci kančích ejakulátů prokázal Hovorka (1984). Weitz a Rath (1987) potvrdili jednoznačně negativní vztahy mezi podílem morfologických změn na spermích a vysokým obsahem mikroorganismů v kančích ejakulátech skladovaných delší dobu. Obdobné poznatky publikovali také Kozumplík a Vlček (1973).

Uvedené poznatky opodstatňují potřebu tlumení růstu mikrobů antibakteriálními léčivy. Jejich použití je však limitováno vedlejšími účinky na spermie i různou citlivostí bakteriálních druhů přítomných v ejakulátech.

Ředidlo s obsahem 1000 IE penicilinu (PNC) a 1000 µg streptomycinu (STM) používal k ředění kančího spermatu Dziuk (1958). Při konzervační teplotě 16 °C prokázal ve 40 % vzorků vyšší vitalitu spermií než v ejakulátech bez antibiotik. Zvýšení dávky obou léčiv však působilo toxicky. Účinky různých koncentrací PNC, STM a sulfonilamidu ověřovali Busch aj. (1969). Růst bakterií nejspolehlivěji potlačovala antibiotika PNC (500 IE) se STM (500 µg v 1 ml ředidla). Vhodná byla také kombinace STM (500 µg) a sulfonilamidu (0,1 % v 1 ml ředidla).

Kozumplík a Vlček (1973) zaznamenali nejlepší výsledky v ejakulátech ředěných ředidlem obsahujícím 0,04 g STM, 50 000 IE PNC a 0,4 g sulfonilamidu ve 100 mililitrech.

Pro zvyšující se rezistenci mikroorganismů vyskytujících se v ejakulátech kančů na PNC a STM testovali Bamba aj. (1980) sulbenicilin, který má širší spektrum účinnosti a větší stabilitu vůči penicilináze. Antibiotikum se osvědčilo a výraznější inhibice mikrobů bylo dosaženo jeho kombinací se STM.

V průběhu testace PNC, STM, penstrepenu, Linco-spectinu, polymyxinu B a gentamycinu dosáhla Mazurová (1981) nejspolehlivějších výsledků při použití ředidla s penstrepenem (350 IE PNC a 350 µg STM v 1 ml). Linco-spectin (500 µg), stejně i PNC (500 IE v 1 ml) nebyly dostatečně účinné zejména na gramnegativní bakterie, gentamycin (80 µg v 1 ml) na streptokoky. Výsledky však byly rozdílné v závislosti na počátečním obsahu mikroorganismů, zjištěném po odběru i na poměru ředidla a ejakulátu při ředění.

Při testaci různých koncentrací apralanu (APRA) zjistili Kozumplík a Vlček (1982), že antibiotikum v množství do 2 mg na 100 ml ředěného ejakulátu množení mikrobů výrazněji nezabraňuje. Lepší výsledky pozorovali s koncentrací kolem 20 mg,

kdy byla statisticky významně pozitivně ovlivněna pohyblivost spermií, ale zároveň větší poškození akrozómů.

Sone aj. (1982) sledovali 74 ejakulátů s obsahem 100 μg dibekacinu v 1 ml, uchovávaných při teplotě 15 °C. Ani po sedmi dnech nevyrostly z 80 % vzorků žádné bakterie. Motilita dosahovala 76 % a normální akrozómy mělo 82,7 % spermií. Ejakuláty se osvědčily i v inseminaci prasnic.

Gentamycin v koncentraci 0,3 obj. % přidávali do ejakulátů Moroz a Makucha (1986). Použité množství účinně potlačovalo růst přítomných mikroorganismů a oplodněnost prasnic inseminovaných takto ošetřeným spermatem dosahovala 83,3 %.

Weitze a Rath (1987) prokázali ve svých šetřeních nedostatečné účinky PNC a STM, zejména při vysoké počáteční kontaminaci kančích ejakulátů. Aplikací gentamycinu a baytirilu dosáhli již po 16 h velkého poklesu počtu bakterií. Autoři doporučují použití nových, účinnějších antibiotik, které by zajistily i přes vyšší náklady výrazné snížení kontaminace.

Rovněž cílem naší práce bylo ověření účinku některých antibiotik na mikroorganismy přítomné v kančích ejakulátech s perspektivou jejich využití k redukci kontaminace inseminačních dávek.

MATERIÁL A METODY

V pokusu jsme použili antibiotika ampicilin (AMP) inj. Spofa, apramycin (APRA)-apralan powder solub. Elanco, cefoxitin (CEF) inj. Spofa, gentamycin (GENT) inj. Pharmachin, penstrepten (PENST) inj. Biotika, n. p.

Pro testování účinnosti na mikroorganismy v ejakulátech byla antibiotika přidávána do ředidla jednotlivě a v kombinacích. Ejakuláty byly ředěny v poměru 1:4, čímž bylo dosaženo následujících koncentrací účinných látek v 1 ml ředěného spermatu:

a) jednotlivých antibiotik	AMP	200 μg	
	APRA	80 μg	
	CEF	32 μg	
	GENT	32 μg	
b) antibiotik v kombinaci	PNC	160 IE + STM	160 μg
	AMP	200 μg + CEF	32 μg
	GENT	16 μg + CEF	32 μg
	AMP	200 μg + GENT	16 μg

Ve dvou etapách jsme vyšetřovali nativní a ředěné ejakuláty ze dvou inseminačních stanic pro kance a ředidla použitá k ředění. Každý ejakulát byl rozdělen na pět dílů, z toho první byl vyšetřen v nativním stavu 24 h po odběru. Ostatní díly byly ředěny ředidly obsahující jednotlivá antibiotika nebo kombinace antibiotik a vyšetřovány za 24, 48 a 72 h po naředění, provedeném do 3 až 4 h po odběru. Během vyšetřování byly vzorky uchovávány při teplotě přibližně 18 °C.

Pro průkaz jednotlivých bakteriálních druhů byly ejakuláty kultivovány na krevní agar připravený ze základu pro krevní agar č. 4 (Imuna, Šarišské Michalany) se 7 % beraní krve a na Endovu půdu stejné provenience. K stanovení počtu mikroorganismů v 1 ml byly ejakuláty ředěny 0,85% roztokem NaCl v poměru 10^{-1} až 10^{-4} . Jednotlivá ředění byla zalévána masopeptonovým agarem s laktózou (Imuna, Šarišské Michalany). Naočkovaná média byla inkubována 48 h při teplotě 37 °C. Celkové počty byly hodnoceny po 72hodinové inkubaci při 37 °C a následné 24hodinové inkubaci při laboratorní teplotě.

Izolované kmeny byly typizovány podle laboratorních vyšetřovacích metod ÚSVÚ a Enterotestem (Lachema, Brno).

VÝSLEDKY

Výsledky dosažené v průběhu šetření uvádíme v tabulkách I až VIII.

Jak je zřejmé z údajů v tab. I všechny nativní ejakuláty obsahovaly mikroorganismy. Mezi nejčastěji vyskytující se druhy patřily *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* (63,3 %) a *Pseudomonas aeruginosa* (51,5 % vyšetřených vzorků). Z ostatních bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, které kontaminovaly 77,9 % vzorků byly vykultivovány *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Morganella morganii*, *Providencia* sp. a *Klebsiella* sp. Ve skupině ostatních gramnegativních mikroorganismů převažovaly rody *Alcaligenes* a *Aeromonas*. Streptokoky byly izolovány pouze

I. Přehled o výskytu mikroorganismů v nativních a ředěných kančích ejakulátech za 24 h po naředění — A survey of the occurrence of microorganisms in native and diluted boar ejaculates in 24 h after dilution

Etapa ¹	Antibiotikum dodané ředidlem ²	n	Bakteriálně pozitivních vzorků ³ [%]	Z toho % ejakulátů obsahujících ⁴					
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus</i> sp.	ostatní ⁵ <i>Enterobacteriaceae</i>	ostatní gramnegativní ⁶	streptokoky	ostatní grampozitivní ⁷
I	bez antibiotik**	44	100,0	50,0	59,1	75,0	34,1	6,8	9,1
	ampicilin	44	84,1	45,4	31,8	25,0	25,0	2,3	2,3
	penstrepten	44	77,3	11,4	22,7	45,4	22,7	6,8	2,3
	gentamycin	44	84,1	4,5	2,3	2,3	38,6	—	—
	apramycin	44	93,2	—	18,2	11,4	40,9	58,6	4,5
II	bez antibiotik**	24	100,0	54,2	70,8	83,3	50,0	—	50,4
	cefoxitin	24	95,8	54,2	16,7	25,0	29,2	16,7	20,8
	ampicilin + cefoxitin	24	70,8	45,8	4,2	4,2	20,8	—	—
	gentamycin + cefoxitin	24	41,7	4,2	4,2	4,2	4,2	25,0	4,2
	ampicilin + gentamycin	24	12,5	4,2	—	—	4,2	4,2	—

** nativní ejakuláty — native ejaculates

¹stage, ²antibiotic applied in diluent, ³of bacterially positive samples, ⁴of this: % of ejaculates containing, ⁵others, ⁶other gram-negative, ⁷other gram-positive

II. Přehled o výskytu mikroorganismů v ředěných kančích ejakulátech za 48 h po naředění — A survey of the occurrence of microorganisms in diluted boar ejaculates in 48 h after dilution

Etapa ¹	Antibiotikum dodané ředidlem ²	n	Bakteriálně pozitivních vzorků ³ [%]	Z toho % ejakulátů obsahujících ⁴					
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus</i> sp.	ostatní ⁵ <i>Enterobacteriaceae</i>	ostatní gramnegativní ⁶	streptokoky	ostatní grampozitivní ⁵
I	ampicilin	44	84,1	34,1	36,4	22,7	18,2	—	2,3
	penstrepten	44	79,6	6,8	22,7	36,4	36,4	4,5	—
	gentamycin	44	90,9	2,3	2,3	2,3	45,4	40,9	2,3
	apramycin	44	95,5	4,5	15,9	9,1	50,0	52,3	6,8
II	cefoxitin	24	95,8	54,2	12,5	20,8	20,8	25,0	8,3
	ampicilin + cefoxitin	24	50,0	33,3	—	—	20,8	8,3	—
	gentamycin + cefoxitin	24	54,2	—	8,3	—	4,2	37,5	—
	ampicilin + gentamycin	24	12,5	4,2	—	—	4,2	8,4	—

For 1—7 see Tab. I

ze tří vzorků (4,4 %), z ostatních grampozitivních mikrobů zejména stafylokoky (*S. aureus* 4,4 %), dále *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., aerobní streptomycety a ojediněle i kvasinky.

Počty kontaminovaných ředěných ejakulátů se podle obsažených antibiotik pohybovaly za 24 h po naředění od 12,5 do 95,8 %, za 48 h od

III. Přehled o výskytu mikroorganismů v ředěných kančích ejakulátech za 72 h po naředění — A survey of the occurrence of microorganisms in diluted boar ejaculates in 72 h after dilution

Etapa ¹	Antibiotikum dodané ředidlem ²	n	Bakteriálně pozitivních vzorků ³ [%]	Z toho % ejakulátů obsahujících ⁴					
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus</i> sp.	ostatní ⁵ <i>Enterobacteria</i>	ostatní gramnegativní ⁶	streptokoky	ostatní grampozitivní ⁷
I	ampicilin	44	86,4	22,7	40,1	25,0	18,2	2,3	—
	penstrepten	44	90,9	4,5	27,3	38,6	38,6	2,3	2,3
	gentamycin	44	95,5	4,5	11,4	2,3	50,0	36,4	2,3
	apramycin	44	95,5	—	29,5	13,6	61,4	43,2	—
II	cefoxitin	24	95,8	54,2	8,3	12,5	12,5	45,8	8,3
	ampicilin + cefoxitin	24	62,5	29,2	—	—	20,8	8,3	4,2
	gentamycin + cefoxitin	24	58,3	—	4,2	—	12,5	45,8	—
	ampicilin + gentamycin	24	16,7	4,2	—	—	4,2	4,2	—

For 1—7 see Tab. I

IV. Počty mikroorganismů zjištěné v 1 ml ředěných kančích ejakulátů v různých časových intervalech po naředění — The counts of microorganisms determined in 1 ml of diluted boar ejaculates in different time intervals after dilution

Etapa ¹	Antibiotikum dodané ředidlem ²	Počet mikroorganismů ³ v 1 ml					
		za 24 h		za 48 h		za 72 h	
		průměr ⁴	rozmezí ⁵	průměr ⁴	rozmezí ⁵	průměr ⁴	rozmezí ⁵
I*	ampicilin	547	0—2 220	1 096	0—8 600	2 702	0—14 900
	penstrepten	632	0—4 640	1 793	0—11 300	5 731	0—68 400
	gentamycin	416	0—3 960	955	0—4 480	2 260	0—12 480
	apramycin	1 244	0—6 720	2 730	0—7 760	6 033	0—46 800
II**	cefoxitin	2 704	0—30 400	6 276	0—59 600	13 979	0—105 000
	ampicilin + cefoxitin	1 033	0—7 920	591	0—5 480	988	0—6 300
	gentamycin + cefoxitin	89	0—560	658	0—6 880	3 660	0—63 200
	ampicilin + gentamycin	14	0—280	20	0—320	21	0—280

* Průměrný počet mikroorganismů v 1 ml nativních ejakulátů za 24 h po odběru 2 363 000 — Average counts of microorganisms in 1 ml of native ejaculates in 24 h after sampling — 2 363 000

** Průměrný počet mikroorganismů v 1 ml nativních ejakulátů za 24 h po odběru 1 472 108 — Average counts of microorganisms in 1 ml of native ejaculates in 24 h after sampling — 1 472 108

¹stage, ²antibiotic applied in diluent, ³microorganism counts, ⁴average, ⁵range

12,5 do 98,5 % a za 72 h od 16,8 do 95,8 % z celkem vyšetřených vzorků. Z výsledků zaznamenaných v tab. I až III je patrné, že nejnižší počty kontaminovaných ejakulátů byly ve všech časových intervalech při použití ředidel obsahujících AMP v kombinaci s GENT (12,5 % vzorků za

24 h — 12,5 % za 48 h — 16,7 % za 72 h). Z ejakulátů, které obsahovaly pouze AMP byly vykultivovány gramnegativní mikroorganismy, zejména *Pseudomonas aeruginosa* (45,4 % — 34,1 % — 22,7 %). Ve spermatech ředěných ředidly s GENT se vyskytovaly vedle skupiny ostatních gramnegativních bakterií hlavně streptokoky (38,6 % — 40,9 % — 36,4 %). Výskyt jednotlivých druhů mikroorganismů v ředěných ejakulátech většinou koreloval se spektrem účinnosti obsažených antibiotik.

Průměrné počty mikroorganismů v 1 ml nativních ejakulátů, zjištěné v I. etapě dosahovaly 2 363 000, ve II. etapě 1 472 108.

V. Zařazení nativních kančích ejakulátů do skupin podle celkových počtů mikroorganismů zjištěných v 1 ml za 24 h po odběru — Division of native boar ejaculates into groups with respect to the total counts of microorganisms determined in 1 ml in 24 h after sampling

Lokalita ¹	n	Počet mikroorganismů ² v 1 ml									
		5 000		5 000—10 000		10 000 až 50 000		50 000 až 100 000		100 000	
		počet eja-kulá-tů ³	%	počet eja-kulá-tů ³	%	počet eja-kulá-tů ³	%	počet eja-kulá-tů ³	%	počet eja-kulá-tů ³	%
I	36	—	—	2	5,5	4	11,1	4	11,1	26	72,3
II	32	4	12,5	2	6,2	10	31,3	3	9,4	13	40,6
Celkem ⁴	68	4	5,9	4	5,9	14	20,6	7	10,3	39	57,3

¹locality, ²microorganism counts, ³number of ejaculates, ⁴total

VI. Zařazení ředěných kančích ejakulátů do skupin podle celkových počtů mikroorganismů zjištěných v 1 ml za 24 h po naředění — Division of diluted boar ejaculates into groups with respect to the total counts of microorganisms determined in 1 ml in 24 h after dilution

Obsažené antibiotikum ¹	Vyšetřeno ejakulátů ²	Celkový počet mikroorganismů ³ v 1 ml					
		1000		1000—5000		5000	
		počet eja-kulá-tů ⁴	%	počet eja-kulá-tů ⁴	%	počet eja-kulá-tů ⁴	%
Ampicilin	44	32	72,7	8	18,2	4	9,1
Penstrepten	44	31	70,5	9	20,4	4	9,1
Gentamycin	44	35	79,5	9	20,4	—	—
Apramycin	44	28	63,7	13	29,5	3	6,8
Cefoxitin	24	13	54,2	7	29,2	4	16,6
Ampicilin + cefoxitin	24	20	83,4	2	8,3	2	8,3
Gentamycin + cefoxitin	24	24	100,0	—	—	—	—
Ampicilin + gentamycin	24	23	95,8	1	4,2	—	—

¹used antibiotic, ²number of examined ejaculates, ³total counts of microorganisms, ⁴number of ejaculates

Jak vyplývá z údajů v tab. III a IV nejvyšší průměrné počty v 1 ml ředěného spermatu se vyskytovaly v ejakulátech obsahujících CEF (30 400 za 24 h — 59 600 za 48 h — 105 000 za 72 h po naředění) nebo APRA (1 244 — 2 730 — 6 033). Z antibiotik přidávaných jednotlivě byl nejúčinnější GENT (416 — 955 — 2 260), z kombinací směs AMP s GENT (14 — 20 — 21).

VII. Zařazení ředěných kančích ejakulátů do skupin podle celkových počtů mikroorganismů zjištěných v 1 ml za 48 h po naředění — Division of diluted boar ejaculates into groups with respect to the total counts of microorganisms determined in 1 ml in 48 h after dilution

Obsažené antibiotikum ¹	Vyšetřeno ejakulátů ²	Celkový počet mikroorganismů ³ v 1 ml					
		< 1000		1000—5000		> 5000	
		počet eja-kulátů ⁴	%	počet eja-kulátů ⁴	%	počet eja-kulátů ⁴	%
Ampicilin	44	24	54,6	13	29,5	7	15,9
Penstrepten	44	22	50,0	14	31,8	8	18,2
Gentamycin	44	29	65,9	11	25,0	4	9,1
Apramycin	44	14	31,8	12	27,3	18	40,9
Cefoxitin	24	9	37,5	8	33,3	7	29,2
Ampicilin + cefoxitin	24	21	87,5	2	8,3	1	4,1
Gentamycin + cefoxitin	24	20	83,4	3	12,5	1	4,1
Ampicilin + gentamycin	24	23	95,8	—	—	1	4,1

For 1—4 see Tab. VI

VIII. Zařazení ředěných kančích ejakulátů do skupin podle celkových počtů mikroorganismů zjištěných v 1 ml za 72 h po naředění — Division of diluted boar ejaculates into groups with respect to the total counts of microorganisms determined in 1 ml in 72 h after dilution

Obsažené antibiotikum ¹	Vyšetřeno ejakulátů ²	Celkový počet mikroorganismů ³ v 1 ml					
		< 1000		1000—5000		> 5000	
		počet eja-kulátů ⁴	%	počet eja-kulátů ⁴	%	počet eja-kulátů ⁴	%
Ampicilin	44	15	34,1	16	34,6	13	29,5
Penstrepten	44	17	38,6	10	22,7	17	38,6
Gentamycin	44	16	36,3	19	43,2	9	20,5
Apramycin	44	10	22,7	13	29,6	21	47,7
Cefoxitin	24	7	29,2	5	20,8	12	50,0
Ampicilin + cefoxitin	24	20	83,4	2	8,3	2	8,3
Gentamycin + cefoxitin	24	17	70,8	4	16,7	3	12,5
Ampicilin + gentamycin	24	23	95,8	—	—	1	4,2

72 h after dilution

Podle zjištěných celkových počtů mikroorganismů v 1 ml odpovídaly požadavkům kladeným na sperma pro inseminaci ON 46 7115 pouze čtyři nativní ejakuláty (5,9 %), (tab. V). Z ředěných nevyhovovaly za 24 h po naředění čtyři (9,1 %) s obsahem AMP, stejný počet obsahující PENST nebo CEF, tři (6,8 %) s APRA a dva (8,3 %) ejakuláty ředěné ředidly s antibiotiky CEF v kombinaci s AMP. Po 48 i 72 h skladování obsahovalo více než 5000 mikroorganismů v 1 ml nejvíce ejakulátů obsahujících APRA (40,9 % vzorků po 48 h; 47,7 % po 72 h) nebo CEF (29,2 %; 50,0 %). Dobrých výsledků bylo dosaženo při použití antibiotik v kombinaci, z nichž nejúčinnější byla směs AMP s GENT. V ejakulátech obsahujících tato léčiva nebyly zjištěny počty nad stanovenou normu v žádném vzorku za 24 h po naředění a pouze v jednom (4,1 %) za 48 i 72 h (tab. VI až VIII).

DISKUSE

V průběhu šetření jsme na rozdíl od Busche aj. (1969), Kozumplík (1975) i Soneho aj. (1982) izolovali z nativních ejakulátů častěji mikroorganismy čeledi *Enterobacteriaceae* (77,9 % vzorků), přičemž *Proteus* sp. obsahovalo 63,2 % ejakulátů. *Pseudomonas aeruginosa* kontaminoval pouze 51,5 % vyšetřených vzorků.

Shodně jako Aamdal aj. (1958), Busch aj. (1969), Kozumplík (1975), Gamčík a Nemeš (1981), Weitze a Rath (1987) i další autoři jsme zjišťovali různé počty živých bakteriálních buněk v 1 ml nativních ejakulátů, získaných od jednotlivých plemenů. Rozdíly dosahovaly až miliónových hodnot již za 24 h po odběru. Rovněž jsme zaznamenali značné rozdíly v kvantitě i mezi inseminačními stanicemi, z nichž ejakuláty pocházely.

Vzhledem k relativně velké variabilitě výskytu mikroorganismů v nativních ejakulátech kančů, potřebné skladovací teplotě kolem 16 °C, tj. teplotě, která nebrání, ale spíše podporuje růst přítomných bakterií, čímž jsou potencionovány jejich negativní vlivy na spermie, jak prokázali Kozumplík a Vlček (1973), Hovorka (1984) i Weitze a Rath (1987), rovněž doporučujeme při konzervaci spermatu aplikaci antibakteriálních přípravků. Je však nutné přidávat substance účinné na všechny bakteriální druhy vyskytující se v ejakulátech.

V prvních pokusech o ovlivnění kontaminace kančích ejakulátů antibiotiky se osvědčily PNC a STM. Jejich dlouhodobé používání však mělo za následek nárůst rezistence mikrobů, jak zjistili Bamba aj. (1980) a dále potvrdili i Weitze a Rath (1987). Cílem našeho pokusu nebylo sledování rezistence na uvedená antibiotika, ale z výsledků je zřejmé, že koncentrace 160 IE PNC ve směsi se 160 µg STM v 1 ml ředěného spermatu nebyla dostatečně účinná, zejména při silné počáteční kontaminaci. Zaznamenané výsledky nemůžeme srovnat s publikovanými údaji, neboť autoři uvádějí koncentraci použitého léčiva v ředidle bez udání poměrů ředění. Prokázané toxické účinky vyšších koncentrací obou léčiv (Džířuk, 1958; Busch aj., 1969) i toxicita některých šarží STM (Hovorka, 1984, 1985; Jiránek — ústní sdělení) svědčí, že použití těchto antibiotik není optimální.

Stejně jako Kozumplík a Vlček (1982) jsme nezaznamenali výrazné snížení kontaminace APRA (80 µg v 1 ml ředěného spermatu) i když námi použitá koncentrace účinné látky byla čtyřikrát vyšší. APRA

nebyl účinný zejména na streptokoky, jejichž nálezy v ejakulátech obsahujících toto léčivo převažovaly.

AMP v koncentraci 200 μg v 1 ml ředěného spermatu dostatečně nepotlačoval růst zejména *Proteus* sp. (40,1 % pozitivních vzorků) i *Pseudomonas aeruginosa* (22,7 %). Toto antibiotikum je od roku 1985 běžně přidáváno do ředidel určených ke konzervaci kančích ejakulátů v množství 250 mg do 1000 ml ředidla.

Nejvýraznější snížení kontaminace jednotlivými antibiotiky jsme shodně jako Sone aj. (1982), Moroz a Makucha (1986) a Weitz a Rath (1987) zaznamenali po aplikaci GENT. Obdobně jako v dřívějším pokusu (Mazurová, 1981) jsme však prokázali jeho nedostatečnou účinnost na streptokoky (38,6 % pozitivních vzorků za 24 h, 40,9 % za 48 h a 36,4 % za 72 h po naředění) a proto samotné použití tohoto antibiotika rovněž nesplňuje požadovaná kritéria.

Z uvedeného je zřejmé, že dekontaminaci kančích ejakulátů nelze spolehlivě realizovat pouze jednotlivými léčivy. Jednou z možností je použití jejich kombinací, postihujících co nejširší spektrum mikrobiální směsi vyskytující se ve spermatu, přičemž neovlivní negativně pohlavní buňky.

Kombinace PNC se STM se z počátku osvědčovala. Vývoj dalších, účinnějších antibiotik, prokázaná přirozená i získaná odolnost některých druhů i jednotlivých bakteriálních buněk na použitelné koncentrace obou léčiv byla příčinou ověřování nových možností. Jako vhodnou označili Busch aj. (1969) i Kozumplík a Vlček (1973) kombinaci PNC + STM + sulfonamidy. Přestože zcela nezabránila růstu přítomných mikroorganismů bylo dosaženo průkazně kladných výsledků v přežitelnosti spermií.

Také sulbenicilin v kombinaci se STM byl účinnější, jak zjistili Bamba aj. (1980). Výsledky, které publikoval Hovorka (1985) nebo Weitz a Rath (1987) rovněž svědčí ve prospěch aplikace léčiv v kombinaci. I údaje v naší práci dokumentují spolehlivější výsledky při kombinované medikaci. Potvrzují i skutečnost, že kombinované užití antibiotik má svá pravidla, které nutno respektovat, aby bylo dosaženo cíleného efektu. Největšího snížení kontaminace jsme docílili kombinací AMP s GENT, a to jednak pro synergické působení obou léčiv a jednak pro jejich široké antibakteriální spektrum. Tato kombinace vykazovala velmi dobrou účinnost na *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus* sp., které jsou frekventovanými kontaminanty kančích ejakulátů a s jejich tlumením byly dosud problémy. Použité účinné koncentrace rovněž neovlivňovaly negativně pohlavní buňky.

Z našich šetření i z publikovaných zpráv je však zřejmé, že antibakteriální léčiva ani v kombinaci zcela nezabránila růstu mikroorganismů ve spermatu během jeho uchovávání v požadovaných podmínkách, zejména v případech silné počáteční kontaminace. Citlivost mikrobů se liší kmen od kmene i uvnitř druhu, rovněž koncentrace účinné látky se v průběhu skladování snižuje. Nezbytnou součástí získání biologicky kvalitních ejakulátů pro inseminaci jsou proto i přísná hygienická opatření v chovech plemeníků, při odběru spermatu i jeho zpracování.

Literatura

AAMDAL, J. — FILSETH, J.: Extirpation of the preputial diverticulum of boars used in artificial insemination. J. Amer. veter. med. Assoc., 132, 1958, s. 524.

- BAMBA, K. — HASHIGUCHI, T. — KOLIMA, Y. — SONE, M.: Effect of antibiotics on the storage of boar semen at 15 °C. *Jap. Swine Sci.*, 17, 1980, s. 91—95.
- BORYCZKO, Z.: Der Einfluss von *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* auf die metabolischen Prozesse die Vitalität von Bullspermien. *Zuchthygiene*, 17, 1982, s. 13—18.
- BUSCH, W. — STREY, A. — PÄPLOW, C.: Untersuchungen zum Keimgehalt und zur Keimhemmung mittels antibakterieller Zusätze im Ebersperma. *Mh. Veter.-Med.*, 12, 1969, s. 441—449.
- DZIUK, P. J.: Dilution and storage of boar semen. *J. anim. Sci.*, 17, 1958, s. 548.
- FEJEŠ, J. — GREČ, P. — LUČANSKÝ, J. — TKÁČ, L.: Kvalita inseminačních dávek spermy kanců a inseminácia prasnic vo Východoslovenskom kraji. *Náš Chov (Praha)*, 1989, č. 9, s. 408—410.
- GAMČÍK, P. — NEMEŠ, D.: Bakteriálny nález v ejakulátě kanců. Reprodukcia hospodárskych zvierat. Sbor. Ref. V. Pribylových dní v Košicih, 1981, s. 53—55.
- HOVORKA, J.: Problematika konzervace kančího semena. *Veterinářství*, 34, 1984, s. 264 až 268.
- HOVORKA, J.: Někteří zkušenosti s použitím antibiotik v ředidle pro konzervaci semen plemenných kanců. *Veterinářství*, 35, 1985, s. 257—260.
- HEIDRICH, H. J. — ROHLOFF, D. — PUSCH, U.: Beitrag zur Eberspermakonservierung CO₂ — Konservierung der spermienreichen Hauptphase in eidotterhaltigen Verdünnern. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 71, 1964, s. 662.
- KOZUMPLÍK, J.: Vliv úrovně hygieny ošetřování plemeníků a techniky odběru semen na počty zárodků v ejakulátu kance. *Veter. Med. (Praha)*, 20, 1975, s. 519—526.
- KOZUMPLÍK, J. — VLČEK, Z.: Bakteriální kontaminace v jednotlivých frakcích a celém ejakulátu kance. Reprodukce a genetika hospodářských zvířat, 1970, č. 2, s. 35—41.
- KOZUMPLÍK, J. — VLČEK, Z.: Vliv jednotlivých ředidel na stupeň bakteriální kontaminace semen v průběhu jeho konzervace. Reprodukce a genetika hospodářských zvířat, 1973, č. 1, s. 3—8.
- KOZUMPLÍK, J. — VLČEK, Z.: Vliv různé koncentrace Apralanu na délku přežitelnosti spermií během krátkodobé konzervace semen. In: Souhrnné zprávy o výsledcích testace Apralanu, 1982.
- KROLINSKI, J.: Wplyw *Pseudomonas aeruginosa* na przeżywalność plemników w nasieniu bugajów. *Med. wet.*, 5, 1977, s. 298—299.
- LINGAM, S. A. — CAMPBELL, E. A.: Artificial insemination of pigs in Australia II. Handling and preservation of semen. *Austral. veter. J.*, 41, 1965, s. 151.
- MAZUROVÁ, J.: Účinek antibiotik na mikroorganismy kontaminující ejakuláty kanců. Sbor. Ref. V. Pribylových dní v Košicih, 1981, s. 59.
- MAYER, M. — SONNENSCHNIG, B. — BISPING, W.: Untersuchungen über die samen-schädigende Wirkung der Stoffwechselprodukte von *Staphylococcus aureus*. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, 93, 1980, s. 66—74.
- MOROZ, I. G. — MAKUCHA, I. I.: Obrobootka spermy chřákov gentamycinom. *Veterinarija*, 4, 1986, s. 58—59.
- SACHNO, W. F. — SINJAJEVA, A. A.: Predupreschdenije bakterialni sargjasnennosti semeni chřáka. *Životnovodstvo*, 24, 1962, s. 79.
- SONE, M. J. — OHMURA, K. — BAMBA, K.: Effect of various antibiotics on the control of bacteria in boar semen. *Veter. Rec.*, 111, 1982, s. 11—14.
- WEITZE, K. F. — RATH, D.: Konservierung von Schweinesperma — Ein Zwischenbericht über die laufenden Untersuchungen. *Schweinezucht und Schweinemast*, 35, 1987, s. 391—397.

Došlo dne 2. 5. 1990

MAZUROVÁ, J. — VINTER, P. (State Veterinary Institute, Pardubice; Research Institute for Cattle Breeding, Kostelec nad Orlicí): *The effects of some antibiotics on microorganisms contaminating boar ejaculates*. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991 (4): 213—223.

The occurrence of microorganisms, including their total counts in boar native ejaculates, was investigated in two stages; the objective of this investigation also was to determine contamination after the sperms were treated with diluents containing the antibiotics ampicillin, gentamycin, apramycin, cefoxitin, or antibiotic combinations penicillin + streptomycin, ampicillin + cefoxitin, gentamycin + cefoxitin and ampicillin + gentamycin. The representation of bacterial species and total counts of microbes in 1 ml diluted sperm stored at a temperature of about 18 °C were determined in 24, 48 and 72 h after dilution. The microorganisms were cultivated from all

native ejaculates. *Proteus* sp. (63.3 %) and *Pseudomonas aeruginosa* (51.5 % of the total number of examined samples) were the most frequent species. The number of contaminated diluted ejaculates ranged from 12.5 to 95.8 % in 24 h after dilution, from 12.5 to 98.5 % in 48 h and from 16.8 to 95.8 % of the total number of examined ejaculates in 72 h. The occurrence of microorganisms correlated mostly with the efficiency spectrum of the antibiotics or their combinations. The average counts of microorganisms in 1 ml of native ejaculate made 2 363 000 in stage I and 1 472 108 in stage II. The highest average counts in 1 ml of diluted sperm were found in ejaculates containing cefoxitin and apramycin. Gentamycin was the most effective antibiotic used as a sole component (average counts of microorganisms CPM in 1 ml were 416 in 24 h, 955 in 48 h and 2260 in 72 h after dilution); ampicillin and gentamycin were the most efficient combination (14 — 20 — 21). This combination exerted very good effects also on *Proteus* sp. and *Pseudomonas aeruginosa*.

boar; ejaculate; sperm; microflora; contamination; antibiotics; decontamination

Adresy autorů:

MVDr. Jaroslava Mazurová, CSc., Státní veterinární ústav, Štrossova 239, 530 03 Pardubice

RNDr. Petr Vinter, Výzkumný ústav pro chov prasat, 517 41 Kostelec nad Orlicí

INZERCE

Redakce časopisu nabízí tuzemským i zahraničním firmám možnost inzerce na stránkách časopisu **VETERINÁRNÍ MEDICÍNA**. Prostřednictvím inzerátů uveřejňovaných v našem časopise budou o Vašich výrobcích informováni pracovníci z výzkumu a provozu u nás i v zahraničí.

Bližší informace získáte na adrese:

Redakce časopisu **VETERINÁRNÍ MEDICÍNA**
k rukám ing. Z. Radošové

Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství
Slezská 7
120 56 Praha 2

ADVERTISEMENT

The Editors of the magazine offer to the Czechoslovak as well as foreign firms the possibility of advertising on pages the **VETERINÁRNÍ MEDICÍNA** magazine. Through your adverts published in our magazine, the specialists both from the field of research and production will be informed about your products.

For a more detailed information, please contact:

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
atth. ing. Zdena Radošová

Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství
Slezská 7
120 56 Praha 2

β -D-GLUKOSIDÁZA MIKROVILÓZNÍ ZÓNY ENTEROCYTŮ TENKÉHO STŘEVA PŘI EXPERIMENTÁLNÍ KOKCIDIÓZE SAJÍCÍCH SELAT

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]: *β -D-glukosidáza mikrovilózní zóny enterocytů tenkého střeva při experimentální kokcidióze sajících selat*. Veter. Med. [Praha], 36, 1991 (4): 225—234.

Ve sliznici tenkého střeva 24 gnotobiotických selat experimentálně infikovaných první den po porodu (DPP) oocystami kokcidie *Isospora suis* (infekční dávka 100 000 oocyst) jsme provedli mikrodensitometrické vyhodnocení aktivity β -D-glukosidázy (florizinhydroláza; hetero- β -galaktosidáza; laktázo- β -glukosidázový komplex; EC.3.2.1.21). Pozornost jsme věnovali topochemii enzymu, deponovanému v mikrovilózní zóně enterocytů. Současně jsme aktivitu β -D-glukosidázy studovali v žíhaném lemu enterocytů čtyř kontrolních gnotobiotických selat ve věku 2—5 dnů. Zjistili jsme, že reakční produkt studované disacharidázy je ve vysoké koncentraci u zdravých selat lokalizován v mikrovilózní zóně absorpčních buněk celého tenkého střeva. Prokázali jsme topografický gradient, při kterém aktivita β -D-glukosidázy klesá u kontrolních selat od sliznice duodena směrem aborálním. Při použití substrátu volby pro β -D-glukosidázu (5-Br-4-Cl-3-indolyl- β -D-glukosid) jsme depozici enzymu mimo mikrovilózní zónu enterocytů ve stěně střevní nezjistili. U experimentálně infikovaných selat byl negativní enterální vliv kokcidie *I. suis* prokazatelný již první den po infekci (DPI), kdy se aktivita β -D-glukosidázy snížila v celém tenkém střevě o 15 % (ileum) až 23 % (střední jejunum). Pokles aktivity se od 1. DPI dále prohluboval a svého maxima dosáhl 9. DPI, kdy koncentrace enzymu v mikrovilózní zóně absorpčních buněk dosahovala pouze 11 % úrovně aktivity zjištěné u kontrolních selat. 10. a 11. DPI jsme zaznamenali zvýšení density reakčního produktu β -D-glykosidázy, avšak mikrovilózní zóna byla i v této závěrečné etapě experimentální infekce výrazně deficitní (31 % aktivity sliznice střevní kontrolních selat).

disacharidázy; glukosidázy; žíhaný lem enterocytů; *Isospora suis*; histochemie; mikrodensitometrie; malabsorpce

Ve vztahu k histochemii disacharidáz mikrovilózní zóny enterocytů, mezi které β -D-glukosidáza patří (Lojda, 1974), má zásadní význam atrofie střevních klků a nekróza epitelu, které dominují histopatologickému obrazu střevní sliznice při zmíněné experimentální infekci selat (Stuart a Lindsay, 1986). Významná je rovněž ta skutečnost, že infekce je u nejmladších věkových kategorií selat doprovázena vodnatým průjmem (Ruzicka a Andrews, 1984).

Choroba má v experimentech bifázický průběh, který je charakterizován dvojí alterací sliznice tenkého střeva (3.—4. a 8.—9. DPI), na kterou plynule navazují reparativní a regenerační procesy (5.—7. a 10.—12. DPI; Vítovec a Koudela, 1990). Kromě patologicky změněné

morfologické struktury je sliznice tenkého střeva při isosporóze selat narušena funkčně, což se projevuje celkovou histochemickou destrukcí mikrovilózní zóny a absorpčních a ostatních buněk slizničního povrchu (Kudweis a Lojda, 1988; Kudweis, 1989; Kudweis aj., 1989a, b, c, d).

Mezi významné enzymy žíhaného lemu enterocytů patří disacharidázy, které se podílejí na transportním mechanismu vstřebávání (absorpce, méně správně resorpce; Frič, 1969a; Lojda, 1974). Klasifikace disacharidáz prodělala několik změn. Východiskem k moderní nomenklatuře skupiny těchto enzymů je práce Dahlquistova týmu (Dahlquist a Nordstroem, 1966).

Přínos pro pochopení histochemie disacharidáz a jejich systémové členění mají však především práce autorů Lojda (1969a, b, 1974, 1975), Frič aj. (1975) a Lojda aj. (1979).

Sliznice tenkého střeva selete (konvenčního i gnotobiotického) je na aktivitu disacharidáz bohatá (Lojda aj., 1984; Kudweis a Lojda, 1989a, b, c). Vysokou koncentraci těchto enzymů prokázalo více autorů v mikrovilózní zóně absorpčních buněk také u mláďat jiných druhů zvířat: u telat Landsverk (1980), myši a krysy Lund a Smith (1987) a u králíků Vasseur (1989).

Při infekčním i neinfekčním patologickém poškození sliznice tenkého střeva se aktivita disacharidáz zpravidla mění ve smyslu značné redukce původní koncentrace enzymů. Dokládají to studie provedené na lidských enterálních biopsiích při malabsorpčním syndromu (Frič aj., 1969b; Lojda, 1969c; Frič aj., 1975; Lojda, 1983; Saavedra a Perman, 1989) a práce dalších autorů, kteří prokazovali kinetiku aktivity některých disacharidáz ve sliznici tenkého střeva selat (Hornich aj., 1974; Kudweis, 1989), telat (Landsverk, 1981; Stiglmaier-Herbová a Pospischil, 1986), myši a krysy (Mayberry aj., 1986; Smith a Lloyd, 1989) a také králíků (Kaijian a Xing, 1986).

Naše práce má za cíl, při použití moderní vyhodnocovací techniky, posoudit úroveň aktivity významné disacharidázy ve sliznici tenkého střeva selat, experimentálně infikovaných kokcidii *I. suis*. Studie podává také vysvětlení mechanismu průjemového charakteru onemocnění a současně teoreticky upravuje vztah deficitu β -D-glukosidázy k absorpci cukrů v průběhu infekce.

MATERIÁL A METODA

V naší práci jsme zpracovali tkáň tenkého střeva 24 gnotobiotických selat experimentálně infikovaných 1. DPP oocystami kokcidie *I. suis* (infekční dávka 100 000 oocyst) a čtyř selat kontrolních ve věku 2–5 dnů. Přehled těchto zvířat je uveden v tab. I.

Provedení infekce, přípravu gnotobiotických selat, odběr vzorků tenkého střeva a techniku výroby zmrazených řezů jsme popsali dříve (Kudweis aj., 1989b, d).

Kryostatové (zmrazené) řezy byly zhotoveny na zařízení Frigocut Mod. 2700 (Reichter-Jung, SRN) a jejich síla nepřesahovala 10 μ m. Připravené zmrazené řezy jsme inkubovali v médiu pro detekci β -D-glukosidázy, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 6,5. Jako substrát volby jsme použili 5-Br-4-Cl-3-indolyl- β -D-glukosid podle Lojdy (1970). Metoda se stejným substrátem a s polyvinylpyrolidinem (Pearson, 1961 — cit. Lillie, 1965) o pH inkubačního média 5,4 nedávala uspokojivé výsledky.

Řezy jsme po inkubaci vyhodnotili a aktivitu β -D-glukosidázy jsme stanovili na počítacím řízeném (SAPI-ZPS-2) skanujícím a integrujícím mikrodenzitometru VICKERS-M-86 za použití objektivu 20 $\times$ a clony č. 2 (průměr 2 μ m).

Sele ■	DPP _{in} *	DPI _u **	Věk [†]
ISg 1	1	1	2
ISg 2	1	2	3
ISg 4, 5, 19, 20	1	3	4
ISg 6, 23	1	4	5
ISg 9, 8, 11, 24	1	5	6
ISg 10, 25, 26, 27	1	6	7
ISg 12	1	7	8
ISg 13	1	8	9
ISg 14, 15	1	9	10
ISg 16, 17	1	10	11
ISg 18, 21	1	11	12
K1—K4***	0	0	2—5

■ sele, ISg — *Isospora suis*-gnotobiotické, * infekce ve dny po porodu, ** utracení ve dny po infekci, *** kontrolní selata — ■ farrow, ISg — *Isospora suis*-gnotobiotické, * infection in the days of delivery, ** killed within the days after the infection, *** control farrows

† age

Denzitu reakčního produktu β -D-glukosidázy jsme měřili při vlnové délce 480 nm, která v dané konfiguraci přístroje odpovídala maximální absorpci deponovaného reakčního produktu.

Pro objektivní zjištění denzity studované disacharidázy v mikrovilózní zóně absorpčních buněk jsme její koncentraci měřili celkem na 15 řezech každého úseku tenkého střeva (duodenum, střední a zadní jejunum, ileum), přičemž jsme na jednotlivých řezech prohlédli 15 střevních klků. Na hodnocených střevních klcích jsme denzitu β -D-glukosidázy měřili na 15—20 bodech po celém obvodu střevního klku. Získané údaje jsme statisticky zpracovali a stanovili průměrnou hodnotu denzity ($\bar{Dx}$) reakčního produktu β -D-glukosidázy v mikrovilózní zóně enterocytů pro každý úsek tenkého střeva samostatně.

VÝSLEDKY

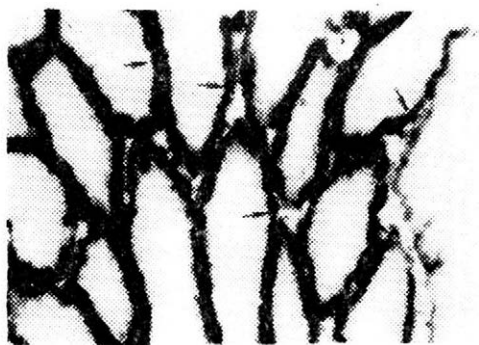
Při studiu aktivity β -D-glukosidázy v oblasti mikrovilózní zóny enterocytů tenkého střeva selat, experimentálně infikovaných kokcií *I. suis* jsme zjistili, že vysokou koncentrací enzymu je vybaven žíhaný lem absorpčních buněk všech studovaných úseků (duodenum, střední a zadní jejunum, ileum).

Nejvíce aktivity β -D-glukosidázy je deponováno v žíhaném lemu enterocytů duodena ($\bar{Dx}$ 264,13; obr. 1), od kterého se koncentrace enzymu směrem aborálním snižuje ($\bar{Dx}$ 260,93; střední jejunum 256,05; zadní jejunum 237,27; ileum).

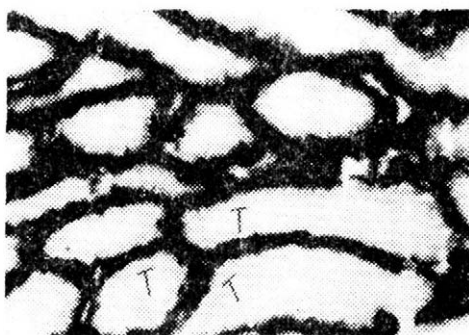
Aktivita β -D-glukosidázy je lokalizována při použitém substrátu pouze v oblasti mikrovilózní zóny enterocytů; není prokazatelná na úrovni lysosomů ani makrofágů submukózy stěny střevní (obr. 2).

U experimentálně infikovaných gnotobiotických selat se koncentrace β -D-glukosidázy v mikrovilózní zóně enterocytů snižuje již 1. DPI, kdy úbytek aktivity kolísá od 15 % (ileum) do 23 % (střední jejunum) v porovnání s kontrolními údaji.

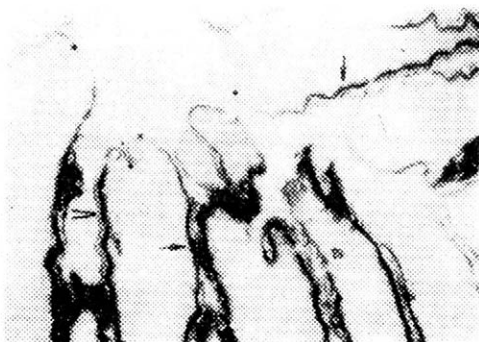
V dalších dnech experimentální infekce (2.—9. DPI) $\bar{Dx}$ reakčního produktu enzymu dále klesá a minimálních hodnot dosahuje 9. DPI. Nejvíce je 9. DPI postižena mikrovilózní zóna enterocytů obou úseků jejunum, v nichž $\bar{Dx}$ β -D-glukosidázy má hodnotu pouze 9 % úrovně aktivity enzy-



1. Reakční produkt β -D-glukosidázy je lokalizovaný při použití substrátu 5-Br-4-Cl-3-indolyl- β -D-glukosidu pouze v mikrovilózní zóně enterocytů. Kontrolní sele ve věku 5 dnů, úsek duodena; → depozice reakčního produktu; zv. 140 $\times$ — The reaction product of β -D-glucosidase is located when using the substrate 5-Br-4-Cl-3-indolyl- β -D-glucoside only in the microvillous zone of enterocytes. A control farrow in the age of 5 days, the section of duodenum; → deposition of reaction product; enlarged 140 $\times$



2. Aktivita β -D-glukosidázy u kontrolního selete ve věku 2 dny v oblasti středního jejunu; —| bazální membrány slizničních buněk; zv. 140 $\times$ — The β -D-glucosidase activity in a control farrow of the age of 2 days within the middle jejunum. —| the basal membranes of mucosa cells; enlarged 140 $\times$



3. Výrazná redukce aktivity β -D-glukosidázy 9. DPI v úseku zadního jejunu. Zbytková aktivita je lokalizována pouze na bocích střevních klků (→), přičemž pozitivní je pouze bazální část mikrovilózní zóny enterocytů (>). Hroty střevních klků jsou vesměs negativní (*); zv. 160 $\times$ — A significant reduction of the β -D-glucosidase activity on the 9th day after the infection within the back jejunum. The residual activity is located only on the sides of intestinal villi (→), while only the basal part of microvillous zone of enterocytes is positive (>). The apices of intestinal villi are predominantly negative (*); enlarged 160 $\times$

mu stejných úseků tenkého střeva kontrolních selat (obr. 3). Zbytková aktivita je deponována především na bocích střevních klků. Celkově je 9. DPI tenké střevo vybaveno 11 % β -D-glukosidázové aktivity při korelaci s $D\bar{x}$ všech úseků tenkého střeva kontrolních zvířat.

2.—9. DPI jsme neprokázali predispozici k hypoaktivitě β -D-glukosidázy u žádného úseku tenkého střeva infikovaných selat.

10.—11. DPI jsme ve sliznici střevní zaregistrovali mírné zvýšení aktivity β -D-glukosidázy, která odpovídala 30 % (10. DPI) až 32 % (11. DPI) úrovně aktivity, zjištěné u kontrolních odběrů. Ani v případě reálné re-

II. Vývoj aktivity β -D-glukosidázy ve sliznici tenkého střeva experimentálně infikovaných selat — statistika* — Development of the β -D-glucosidase activity in the small intestine mucosa of experimentally infected farrows — statistics*

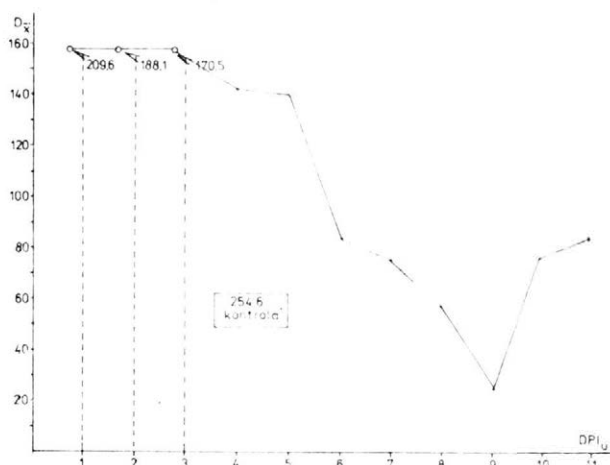
Střevo**	DPI1	DPI2	DPI3	DPI4	DPI5	DPI6	DPI7	DPI8	DPI9	DPI10	DPI11	K1-K4***
D	214,8	200,1	171,1	121,6	138,3	88,7	85,2	53,7	33,2	72,9	88,4	264,1
J ₁	197,3	189,8	168,2	138,2	142,4	85,9	81,8	54,5	22,4	75,1	82,9	260,9
J ₂	208,6	184,6	169,7	150,2	143,9	83,5	76,9	60,8	22,8	76,4	77,1	256,0
I	217,6	177,7	173,2	156,8	137,1	80,5	63,9	63,1	30,8	76,2	73,9	237,3
$\bar{x}$	209,6	188,1	170,5	141,7	140,5	84,6	76,9	58,0	27,3	75,1	80,6	254,6
% ■	82,3	74,0	66,9	55,5	55,1	33,1	29,9	22,8	10,6	29,5	31,4	100,0

* výsledky v $D\bar{x}$, ** střevo, D - duodenum, J₁ - střední jejunum, J₂ - zadní jejunum, ileum, *** kontrolní selata, ■ vývoj aktivity v % —
 * results in $D\bar{x}$, ** intestine, D - duodenum, J₁ - middle jejunum, J₂ - back jejunum, ileum, *** control farrows, ■ activity development in %

konstrukce jsme neprokázali přednostní úpravu aktivity β -D-glukosidázy v některém ze studovaných úseků tenkého střeva (obr. 4). Při obnově aktivity β -D-glukosidázy 10.—11. DPI jsme slabou pozitivitou disacharidázy zaznamenali také na úrovni apexů střevních klků.

Statistika geneze reakčního produktu β -D-glukosidázy, vývoj její D_{546} v mikrovilózní zóně enterocytů infikovaných selat je uveden v tab. II a na obr. 5.

4. Aktivita β -D-glukosidázy 11. DPI v oblasti mikrovilózní zóny absorpčních buněk zadního jejunum. Slabá pozitivita enzymů je patrná také na apexech klků ($\rightarrow$); zv. 160 $\times$ — The β -D-glucosidase activity on the 11th day after the infection within the microvillous zone of absorptive cells of back jejunum. A weak positiveness of enzymes is also visible on the apices of villi ($\rightarrow$); enlarged 160 $\times$



5. Průběh vývoje aktivity β -D-glukosidázy — Development of the β -D-glucosidase activity

DISKUSE

Nomenklatura disacharidáz je složitá a prodělala celou řadu změn. Určité přehledné členění skupiny těchto enzymů podal Dahlquis a Nordstroem (1966).

Práce uvedených autorů se dají ovšem v mnohém podrobit kritice, zejména s ohledem na mikrovilózní disacharidázy. Předně nebyla prováděna v jejich studii morfologická kontrola a samotná aktivita laktázy byla stanovována převážně bez přidání P-Cl-merkuribenzoátu, takže se na udávaných výsledcích různou měrou podílela i lysozomální β -D-galaktosidáza (Lojda, 1970).

Do laktázo- β -glukosidázového komplexu lze podle Lojdy (1975) jednoznačně zařadit laktázu (neutrální- β -galaktosidáza; EC. 3.2.1.23.),

lokalizovanou v mikrovilózní zóně enterocytů a absorpčních buněk krypt ve stadiu diferenciaci; dále kyselou- β -galaktosidázou (β -galaktosid galaktohydroláza; EC. 3.2.1.23.*), deponovanou v lysozomech a β -D-glukosidázou (hetero- β -galaktosidáza; EC. 3.2.1.21.), obsaženou v mikrovilózní zóně diferencovaných enterocytů tenkého střeva (Lojda, 1974; Lojda aj., 1979). β -D-glukosidáza je lokalizována v nižší koncentraci také v cytosolu absorpčních buněk (Frič aj., 1975).

Z uvedeného přehledu je patrné, že stejně jako je heterogenita popisována u maltázy, heterogenní je také laktáza (odtud název laktázo- β -glukosidázový komplex; Frič aj., 1975; Lojda, 1975). Stejný význam zásadního charakteru pro pochopení systematiky disacharidáz skupiny β - mají dále práce Lojdy (1969a, b). Frič aj. (1975) navíc upřesňují optimální pH pro každou disacharidázu laktázo- β -glukosidázového komplexu, které se odlišují, zejména u kyselé β -galaktosidázy.

Sliznice tenkého střeva je vybavena celým laktázo- β -glukosidázovým komplexem (Lojda, 1969a). Dokládají to studie, zabývající se histochemií lidských enterálních biopsií (Lojda, 1969b, 1974) a práce dalších autorů, kteří prokazovali buď celý β -glukosidázový komplex, nebo jeho jednotlivé složky ve střevní sliznici mláďat různých druhů zvířat: selat (Lojda aj., 1984; Kudweis, 1989; Kudweis a Lojda, 1989a, b, c), telat (Landsverk, 1980), myši a krys (Lund a Smith, 1987) a králíků (Vasseur, 1989).

Z uvedených prací však není zřejmé, které konkrétní disacharidázy z laktázo- β -glukosidázového komplexu autoři studovali. Pouze Lojda aj. (1984), Kudweis (1989) a Kudweis a Lojda (1989a, b, c) přesně definují prokazované enzymy. Vycházejí přitom ze substrátové specifity všech tří disacharidáz β -komplexu, jak ji popisují Lojda aj. (1979).

Disacharidázy obecně, tzn. ze skupiny α - i β -glukosidáz, během patologických lézí tenkého střeva, vznikajících v důsledku enterálního vlivu infekční i neinfekční etiologie prodělávají značnou redukci své aktivity.

Tyto výsledky jsou známy na základě výzkumů provedených na lidských enterálních biopsiích u malabsorpčního syndromu, u kterého deficit laktázy mikrovilózní zóny enterocytů prokázali Lojda (1983) a Saavedra a Perman (1989), úbytek aktivity α -D-glukosidáz komentoval Lojda (1969c) a na celkové snížení aktivity obou skupin disacharidáz (α , β) upozornili Frič (1969b) a Frič aj. (1975).

U konvenčních selat na pokles aktivity α -D-glukosidáz (α -D-glukosidázy a maltázy) a β -D-glukosidázy (EC. 3.2.1.21.) při experimentální infekci kokcií *I. suis* upozorňuje Kudweis (1989). Redukci α -D-glukosidázy, β -D-glukosidázy a β -D-galaktosidázy (zřejmě 23*) popisují ve sliznici střevní selat onemocnělých diarreickou kolinfekcí vyvolanou kmeny *Escherichia coli* různých séro skupin Hornich aj. (1974). Variabilní vývoj aktivity β -D-galaktosidázy ve sliznici tenkého střeva průjemujících telat pozorovali Landsverk (1981) a Stiglmair-Herbová a Pospischil (1986). Při spontánní kokcidióze králíků, u které byla jako etiologická agens definována *Eimeria* spp. na pokles aktivity blíže nedefinovaných disacharidáz upozornili Kaajian a Xing (1986). Redukci koncentrace laktázy a sukrázy (α -glukohydroláza) v žíhaném lemu enterocytů u krys a myši popisují při experimentální infekci helminty Mayberry aj. (1986) a Smith a Lloyd (1989).

Kokcidióza sajících selat, vyvolaná experimentálně oocystami *I. suis* má bifázický průběh, který je charakterizován dvojitou alterací sliznice tenkého střeva (3.—4. a 8.—9. DPI), na kterou plynule navazují reparativní a regenerační procesy (5.—7. a 10.—12. DPI; Vítovec a Koudela, 1990). Naše výsledky tuto časovou charakteristiku experimentální infekce jednoznačně nepotvrzují.

Disacharidázy jsou enzymy, které se při své lokalizaci v mikrovilózní zóně enterocytů zúčastňují na hydrolýze disacharidů (Lojda, 1969a, b, 1974).

Disacharid, jehož hydrolýza v tenkém střevě vážně, přechází v nezměněné podobě do tlustého střeva, kde je rychle hydrolyzován bakteriálními disacharidázami. Vzniklé monosacharidy se dále štěpí účinkem dalších mikrobiálních enzymů za vzniku organických kyselin (zejména mléčné a octové) a oxidu uhličitého. Kyseliny vyvolávají vydatnou sekreci vody do střevního lumen jednak přímým iritačním účinkem na sliznici, jednak svou osmotickou aktivitou. Současně se zvyšuje peristaltika střevní a za 30 až 90 minut po požití disacharidu se objevuje vodnatý průjem, který může být zpěněn, obsahuje hojně organických kyselin, hlen a jeho pH obvykle klesá pod fyziologickou normu (Frič aj., 1975).

Vysvětlení vodnatého průjmu u selat, infikovaných kokcií *I. suis*, jak ho popisují Ruzicka a Andrews (1984), spatřujeme jednak v tom, že také v případě infekce gnotobiotických selat jsou zřejmě ve sliznici střevní redukovány aktivity α -D-glukosidáz (u konvenčních selat jsme hypoaktivitu α -D-glukosidáz popsali dříve; Kudweis, 1989) a nově také β -D-glukosidázy.

Znamená to, že příslušné disacharidy nejsou v tenkém střevě hydrolyzovány a přecházejí do střeva tlustého, kde se po prodělané „náhradní“ hydrolýze zásadně podílejí na vzniku průjemového charakteru onemocnění (podle uvedeného schématu; Frič aj., 1975).

Práce ve svém souhrnu představuje aplikovatelné výsledky, korelující s klinickým projevem experimentální isosporózy sajících selat. Tvoří současně dobrá východiska pro výzkumné zaměření zejména v oblasti patologické histochemie a otevírá tak možnosti rozšířit soubor kritérií pro hodnocení patologicko-anatomického obrazu sliznice tenkého střeva selat v období experimentální, ale i spontánní isosporózy.

Poděkování

Autoři děkují vedení Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně za umožnění provést experimentální část práce na gnotobiotických selatech v prostorách ústavu. Současně děkují za velmi pečlivé technické zpracování materiálu Markétě Jakubcové, pracovníci Parazitologického ústavu ČSAV v Českých Budějovicích a Josefu Poncarovi, pracovníkovi Agronomické fakulty Vysoké školy zemědělské v Českých Budějovicích, za kvalitní vypracování fotodokumentace.

Literatura

- DAHLQUIST, A. — NORDSTROEM, C.: The distribution of disaccharidase activities in the villi and crypts of small intestinal mucosa. *Biochim. biophys. Acta.*, 113, 1966, s. 624—626.
- FRIČ, P.: Fyziologie tenkého střeva. In: FRIČ, P. (ed.): Malabsorpční syndrom. Praha, Avicenum 1969a, s. 42—99.
- FRIČ, P.: Patogenese a patofyziologie malabsorpčního syndromu. In: FRIČ, P. (ed.): Malabsorpční syndrom. Praha, Avicenum 1969b, s. 116—181.
- FRIČ, P. — LOJDA, Z. — MALIŠ, F. — JODL, J.: Enzymy sliznice tenkého střeva u malabsorpčního syndromu. In: MAŘATKA, Z. (ed.): Pokroky v gastroenterologii. Praha, Avicenum 1975, s. 225—251.

- HORNICH, M. — SALAJKA, E. — ULMANN, L. — ŠARMANOVÁ, Z.: Enteric *Escherichia coli* infection in piglets. Enzyme histochemical activity in the small intestine of healthy and diarrhoeic piglets. Acta veter. (Brno), 43, 1974, s. 335—346.
- KAIJIAN, L. — XING, L.: Primary study of the coccidiosis rabbits artificially infected with *Eimeria* spp. Chin. J. Rabbit Farming, 2, 1986, s. 27—29.
- KUDWEIS, M.: Histochemie enzymů sliznice tenkého střeva při experimentální infekci selat kokcií *Isoospora suis*. [Kandidátská disertace.] České Budějovice 1989. 225 s. — Parazitologický ústav ČSAV.
- KUDWEIS, M. — LOJDA, Z.: Histochemie tenkého střeva při experimentální isosporóze sajkých selat. In: 30. Morfologický kongres, Brno, 1988, s. 61.
- KUDWEIS, M. — LOJDA, Z.: The small intestine's histochemistry of suckling 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.: Histochemie tenkého střeva sajkých selat. In: 62. Fyziologické dny, Praha, 1989c, s. 17.
- KUDWEIS, M. — LOJDA, Z. — KOUDELA, B. — VÍTOVEC, J.: Syntéza hlenu pohárkových buněk tenkého střeva při experimentální infekci selat kokcií *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 kokcií *Isoospora suis*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989b, s. 287—296.
- KUDWEIS, M. — LOJDA, Z. — VÍTOVEC, J. — KOUDELA, B. — ŠTĚRBA, J.: Úroveň aktivity alkalické fosfatázy během infekce kokcií *Isoospora suis* u selat. Veter. Med. (Praha), 34, 1989c, s. 157—162.
- KUDWEIS, M. — LOJDA, Z. — VÍTOVEC, J. — KOUDELA, B. — ŠTĚRBA, J.: Poměr enterocytů a pohárkových buněk ve sliznici tenkého střeva při experimentální infekci selat kokcií *Isoospora suis*. Veter. Med. (Praha), 34, 1989d, s. 33—38.
- LANDSVERK, T.: Histochemical distribution of enzymes in the small intestine of young milk — fed calves. Acta veter. scand., 21, 1980, s. 402—414.
- LANDSVERK, T.: Histochemical investigation of the intestinal mucosa in diarrhoeic calves. Acta veter. scand., 22, 1981, s. 1—10.
- LILLIE, R. D.: Histopathologic technic and practical histochemistry. New York — Toronto — Sydney — London, McGraw — Hill Book Company 1965, s. 307—349.
- LOJDA, Z.: Cytochemie lidské jejunální sliznice. [Habilitační práce.] Praha 1969a. 138 s. — Univerzita Karlova. Fakulta všeobecného lékařství.
- LOJDA, Z.: Anatomie, histologie, histochemie a elektronová mikroskopie tenkého střeva. In: FRÍČ, P. (ed.): Malabsorpční syndrom. Praha, Avicenum 1969b, s. 19—41.
- LOJDA, Z.: Histochemie a elektronová mikroskopie tenkého střeva u malabsorpčního syndromu. In: FRÍČ, P. (ed.): Malabsorpční syndrom. Praha, Avicenum 1969c, s. 108 až 115.
- LOJDA, Z.: Histochemie der Disaccharidasen und anderer Enzyme im Bürstensaum der Darme. In: ROMMEL, K. — CLODI, P. H. (eds): Biochemische und klinische Aspekte der Zuckerabsorption. Stuttgart — New York, Schattauer Verlag 1970, s. 15—34.
- LOJDA, Z.: Cytochemistry of enterocytes of other cells in the mucous membrane of the small intestine. In: SMYTH, D. H. (ed.): Intestinal Absorption. London — New York, Plenum Press 1974, s. 43—122.
- LOJDA, Z.: Suitability of the azocoupling reaction with 1-naphthyl-beta-D-glucoside for the histochemical demonstration of lactase [lactase-beta-glucosidase complex] in human. In: FILIPE, M. I. — LUKE, B. D. (eds): Histochemistry in Pathology. Edinburgh — London — Melbourne — New York, Churchill — Livingstone 1983, s. 136—144.
- LOJDA, Z. — GOSSRAU, R. — SCHIEBLER, T. H.: Enzyme histochemistry. A laboratory manual. Berlin — Heidelberg — New York, Springer Verlag 1979, s. 101—178.
- LOJDA, Z. — PETRAŠKO, M. — HAVRÁNKOVÁ, E. — LOJDA, L.: Early post-natal development of the brush border enzymes of enterocytes in the rat and mini-pig. Histochem. J., 16, 1984, s. 364—369.
- LUND, E. K. — SMITH, M. W.: Rat jejunal disaccharidase activity increases biphasically during early post-natal development. J. Physiol., 391, 1987, s. 487—497.
- MAYBERRY, L. F. — BRISTOL, J. R. — CAJAS, O. — TELLEZ, G.: Small intestinal sucrase activity during experimental infections with *Nippostrongylus brasiliensis* and or *Eimeria nieschulzi* in rats. Z. Parasitenkde., 72, 1986, s. 561—564.
- RUZICKA, CH. W. — ANDREWS, J. J.: Porcine neonatal coccidiosis: a clinical review. Iowa State Veterinaria, 42, 1984, s. 517—526.

- SAAVEDRA, J. M. — PERMAN, J. A.: Current concepts in lactose malabsorption and intolerance. *Annu. Rev. Nutr.*, 9, 1989, s. 475—502.
- SMITH, M. W. — LLOYD, S.: Intestinal infection with *Nematospiroides dubius* selectively increase lactase expression by mouse jejunal enterocytes. *Clin. Sci.*, 77, 1989, s. 139—144.
- STIGLMAIR-HERBOVÁ, M. T. — POSPISCHIL, A.: A new method for the analysis of intestinal enzyme histochemistry in diarrhoeic and non-diarrhoeic calves. *Anim. Res. and Dev.*, 24, 1986, s. 68—84.
- STUART, B. P. — LINDSAY, D. S.: Coccidiosis in Swine. *Veter. Clin. N. Amer. Fd Anim. Pract.*, 2, 1986, s. 455—468.
- VASSEUR, M.: Purification of the rabbit small intestinal sucrase-isomaltase complex: Separation from other maltases. *Bioscience Rep.*, 3, 1989, s. 341—346.
- VÍTOVEC, J. — KOUDELA, B.: Double alteration of the small intestine in conventional and gnotobiotic piglets experimentally infected with the coccidium *Isospora suis* (*Apicomplexa, Eimeriidae*). *Folia parazit. (Praha)*, 37, 1990, s. 21—33.

Došlo dne 25. 4. 1990

KUDWEIS, M. — LOJDA, Z. — JULIŠ, I. (Research and diagnostical Histochemistry Laboratory of the Regional Hospital, Český Krumlov; Histochemical Laboratory at the Faculty of Medicine of Charles University, Praha): *β -D-glucosidase of the microvillous zone of small intestine enterocytes in the experimental coccidiosis of sucking farrows*. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991 (4): 225—234.

In the small intestine mucosa of 24 gnotobiotic farrows experimentally infected with the oocysts of coccidiosis of *Isospora suis* (infection administration — 100 000 oocysts) on the first day after the delivery, we carried out the microdensitometric evaluation of the activity of β -D-glucosidase (phlorizinhydrolase; hetero- β -galactosidase; lactase- β -glucosidase complex; EC. 3.2.1.21). Great attention was paid to the topochemistry of enzyme, deposited in a microvillous zone of enterocytes. We studied likewise the activity of β -D-glucosidase in the striped fringe of enterocytes of the four control gnotobiotic farrows, in the age from 2 to 5 days. We found out that in healthy farrows the reaction product of studied disaccharidase is located in high concentrations in the microvillous zone of absorptive cells of the whole small intestine. We proved a topographic gradient at which the β -D-glucosidase activity decreases in control farrows the duodenum mucosa in the aboral direction. When using the choice substrate for β -D-glucosidase (5-Br-4-Cl- β -indolyl-3-D-glucoside) we did not prove the enzyme deposition in the small intestine wall. The negative enteral effect of coccidiosis *I. suis* was provable in the farrows experimentally infected already on the first day after the infection (DPI) when the β -D-glucosidase activity decreased within the whole small intestine by 15 % (ileum) and even by 23 % (middle jejunum). The activity reduction had been deepening since the first after the infection and it reached its maximum on the 9th day after the infection when the enzyme concentration in the microvillous zone of absorptive cells reached only 11 % of the activity level found in control farrows. On the 10th and 11th day after the infection we registered the increase of the density of β -D-glucosidase reaction product, however the microvillous zone was even in that final stage of experimental infection significantly deficient (31 % of intestine mucosa activity of control farrows).

disaccharidase; glucosidase; striped fringe of enterocytes; *Isospora suis*; histochemistry; microdensitometry; malabsorption

Adresy autorů:

MVDr. Miloš Kudweis, CSc., Výzkumná a diagnostická histochemická laboratoř nemocnice, Český Krumlov
 Prof. MUDr. Zdeněk Lojda, DrSc., člen koresp. ČSAV, MUDr. Ivan Juliš, Laboratoř pro histochemii, lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Studničkova 2, 128 88 Praha 2

SVOBODOVÁ, V. [Vysoká škola veterinární, Brno]: *Sarkocystóza jehňat*. Veter. Med. [Praha], 36, 1991 [4]: 235—243.

Problematiku sarkocystózy jehňat jsme sledovali z hlediska přenosu protilátek z bahnic na jehňata. Protilátky v krevním séru 26 bahnic zjištěné pomocí nepřímé imunofluorescenční reakce (NFR) kolísaly v rozmezí titrů 640—5120. Jejich mléčno obsahovalo protilátky v titrech 640—5120, přičemž v šesti případech byla jejich hladina vyšší než v krvi. U žádného z novorozených jehňat nebyly před napitím kolostra prokázány protilátky proti sarkocystóze, ale za tři dny jsme již detekovali protilátky v ředění 1:4 až 1:128. Dále jsme sledovali dynamiku titru protilátek u odstavených jehňat. Ve věku 10—18 týdnů jsme prokazovali pouze nízké titry protilátek, od 20. do 24. týdne docházelo k pozvolnému zvyšování titrů a od 26. do 30. týdne se hladina protilátek výrazně zvýšila (titr 5120) s maximem kolem 28. týdne. Zvířata neměla žádné klinické příznaky onemocnění. V další části práce jsme trávicí metodou vyšetřili svalovinu 342 jehňat poražených na jatkách a provedli sérologické vyšetření krve (NFR). Mikrocyty jsme zjistili u 35,67 % jehňat, zatímco makrocyty jsme nenašli u žádného zvířete. Specifické protilátky proti sarkocystóze jsme detekovali u 94,44 % mladých zvířat. Vysoká dynamická diskrepance obou metodik (61,69 %) u mladých zvířat je způsobena výraznou protilátkovou odpovědí při dosud nevyvinutých svalových cystách.

ovce; přenos protilátek; svalové cysty; dynamika titru protilátek

Sarkocystóza je u ovcí velmi rozšířená parazitóza manifestující se tvorbou cyst ve svalovině. V našich podmínkách se touto problematikou zabýval Gut (1982), který využitím trávicí metody zjistil sarkocysty u 92 % ovcí. Obdobné výsledky dosáhly Černá a Merhautová (1981), které zachytily cysty u 82 % zvířat. Svobodová a Nevoile (1985) diagnostikovali sarkocystózu u 64,9 % smíšených vzorků svaloviny bahnic, beranů a jehňat. Z těchto prací vyplývá značné promóření chovů ovcí u nás. Je však třeba sarkocystózu posuzovat specificky také vzhledem k věku zvířat. Pro ovce je nejdůležitějším primárním hostitelem pes, který vylučuje sporocysty patogenních druhů *S. ovis*, *S. arietis* (*S. tenella*) tvořících ve svalovině meziphostitele mikrocyty. Druh, jehož definitivním hostitelem je kočka, se nazývá *S. gigantea*. Je charakteristický tvorbou makrocyt, jejichž růst trvá jeden rok a je považován za nepatogenní [Dubey aj., 1986]. Patogenní druhy jsou známé svým působením na jehňata a březí ovce. Nejvýznamnější klinické

symptomy jsou spojovány s druhou generací schizontů a s penetrací me-rozoitů do svalové tkáně (Tadros a Laarman, 1982). Akutní sarkocystózu jehňat popisuje např. Munday (1979). Jehňata vykazovala příznaky inapetence, teploty, snížené hmotnosti a anémii. Častým doprovodným příznakem je nehnisavá meningoencephalitida (Hilgenfeld a Punke, 1974; Morgan aj., 1984). Postižení nervového systému se projevuje letargií a celkovou změnou chování (Herbert a Smith, 1987). Lokalizace schizontů nebo cyst v míše se manifestuje parézami (Stubbings a Jeffrey, 1985). Landsverk a Bratberg (1979) popsali *polyarthritis nodosa* u jehňat vyvolanou sarkocystami. Klinické a postmortální nálezy závisejí na množství přijatých patogenních sporocyst.

MATERIÁL A METODY

Ve snaze o vytvoření uceleného obrazu sarkocystózy jehňat jsme spojili tři různá pozorování.

VZTAH MEZI PROTILÁTKAMI V KRVÍ A MLEZIVU BAHNIC A V KRVÍ JEHŇAT

V průběhu ledna 1988 jsme odebrali krev 26 bahnícm, chovaným na farmě Spešov, okr. Blansko, těsně před nebo bezprostředně po porodu. Získané sérum jsme vyšetřili na protilátky proti sarkocystóze nepřímou imunofluorescenční reakcí (NFR) v ředění od titru 10 do 10 240. V reakci jsme užívali antigamaglobulinový konjugát králíčí proti ovčím gamaglobulinům značený fluoresceinízothiocyanátem RAS.FITC, vyrobený v Bio-veť Ivanovice na Hané. Z makrocyst *S. gigantea* jsme získali zoity, které jsme po vyčištění používali jako korpuskulární antigen. Vlastní provedení reakce je popsáno v práci Svobodové (1989).

Novorozeným jehňatům jsme ještě před napitím mleziva také odebrali krev a získané sérum opět vyšetřili NFR. Na rozdíl od bahní u jehňat jsme volili základní ředění séra v poměru 1:4. Od bahní jsme oddojili asi 10 ml mleziva a dalším postupem získali mléčné sérum, ve kterém jsme pomocí NFR zjišťovali protilátky proti sarkocystóze. Jehňatům jsme znovu odebrali krev tři dny po narození a sérum vyšetřili opět NFR v ředění od 1:4 do 1:128. V závěru této části práce byly nejdůležitější vztahy a závislosti statisticky vyhodnoceny (Hamilton a Rinaldi, 1988).

DYNAMIKA PROTILÁTEK U JEHŇAT A HODNOTY HEMATOKRITU

V první polovině roku 1987 jsme za účelem zjištění dynamiky titru protilátek proti sarkocystóze na farmě Spešov, okr. Blansko odebírali pravidelně ve 14denních intervalech (celkem 10krát) krev jehňatům. Séra jsme vyšetřovali NFR. Vybrali jsme 32člennou skupinu odstavených jehňat plemene merino, obojího pohlaví, ve věku 12 týdnů, o hmotnosti 20–25 kg, určených k chovu. Po odstavu krmná dávka sestávala ze sena a siláže až do konce dubna, kdy jehňata začala dostávat zelené krmivo. Na farmě chovali dva ovčácké psy a tři koťata, kteří se pohybovali volně mezi ovci. V průběhu sledování jsme prováděli orientované klinické vyšetření zaměřené na výživný stav, hodnoty triasu, stav sliznic a příznaky dehydratace organismu. Ve věku 18, 26 a 30 týdnů jsme odebrali jehňatům rovněž krev na stanovení hodnot hematokritu. Byl vyšetřen metodou mikrohematokritu podle Janetzki.

POSTMORTÁLNÍ PŘÍMÁ A NEPŘÍMÁ DIAGNOSTIKA SARKOCYSTÓZY

Při porážení jsme vyšetřili 342 jehňat a mladých zvířat ve věku do jednoho roku pocházejících ze spádových oblastí jatek v Tišnově, Strakonících, Klatovech a Nymburce. Od každého kusu byl odebrán vzorek svaloviny jícnu a bránice a vzorek krve. Svalovinu jsme vyšetřili adspekci a vzorky pro mikroskopické vyšetření připravili metodou trávící (Nevole a Lukešová, 1981). Pro hodnocení intenzity jsme stanovili následující stupnici: nález 1–2 cyst v sedimentu (+), 3–5 cyst (++) a 6 a více cyst (+++). Krevní sérum jsme vyšetřili metodou NFR v řadě od titru 10 do 10 240 s využitím korpuskulárního antigenu zoitů *S. gigantea*.

VÝSLEDKY

VZTAH MEZI PROTILÁTKAMI V KRVÍ A MLEZIVU BAHNIC A PROTILÁTKAMI U JEHŇAT

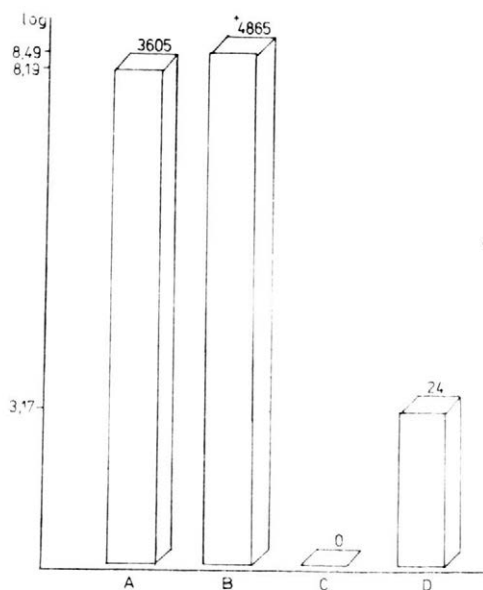
Výsledky sérologických vyšetření vzorků krve bahnic, jejich mleziva a dvou vzorků krve novorozených jehňat (1. odběr před napitím mleziva, 2. odběr ve věku tří dnů) jsou shrnuty v tab. I. Protilátky v krevním séru bahnic kolísaly v ředění 1:640 až 1:5120 (25 ovcí). Pouze u jedné bahnice byl zjištěn titr 80. Mlezivo těchto bahnic obsahovalo protilátky v titru 640—5120. V šesti případech byly v mlezivu titry specifických protilátek nižší než v krvi, ve 12 stejných a v osmi případech vyšší. U žádného z 26 jehňat výše uvedených matek (v případech, kdy se narodila dvojčata, bylo testováno pouze jedno jehně z vrhu) nebyly v séru před napitím mleziva prokázány protilátky proti sarkocystóze. Za tři dny jsme u jehňat zjišťovali protilátky v ředění 1:4 až 1:128 a jedno jehně bylo sérologicky negativní.

I. Vztah mezi protilátkami v krvi a mlezivu bahnic a protilátkami jejich jehňat — Relation between the antibodies in blood and in the colostrum of ewes and the antibodies of lambs

Kategorie ¹	Titr specifických protilátek (počet zvířat s protilátkami v příslušném titru) ⁸				
	80 (1)	640 (3)	1280 (4)	2560 (3)	5120 (15)
Bahnice ²					
Sérum ³	1280 (1)	640 (1)	5120 (4)	2560 (2)	640 (1)
Mlezivo ⁴		5120 (2)		5120 (1)	2560 (5)
					5120 (9)
Jehňata ⁵					
Sérum ³	0 (1)	0 (3)	0 (4)	0 (3)	0 (15)
(před napitím ⁶)	8 (1)	16 (2)	4 (1)	32 (1)	0 (1)
Sérum ³		32 (1)	16 (1)	64 (2)	4 (3)
(třetí den) ⁷			32 (1)		8 (2)
			64 (1)		16 (3)
					32 (2)
					64 (2)
					128 (2)

¹category, ²ewes, ³serum, ⁴colostrum, ⁵lambs, ⁶(before drinking), ⁷(on the third day), ⁸the titre of specific antibodies (number of animals with antibodies in the corresponding titre)

V závěru sledování jsme provedli statistické vyhodnocení vztahu mezi množstvím protilátek v séru bahnic a jejich mlezivu a dále pak srovnání hladiny protilátek v mlezivu bahnic a krevním séru jehňat po napití. Statisticky určenou průměrnou výšku titru v každé testované skupině znázorňuje obr. 1. Zjistili jsme, že nelze prokázat žádný vztah mezi těmito parametry.



1. Protílátky bahnic a jejich jehňat (statistické vyhodnocení) — The antibodies of ewes and of their lambs (statistic evaluation)

* = průměrný litr protilátek získaný odlogaritmováním, A — bahnice před porodem, B — mlezivo, C — jehňata před napitím, D — jehňata třetí den — * = the mean titre of antibodies obtained by finding the antilogarithm, A — ewes before parturition, B — colostrum, C — lambs before drinking, D — lambs on the third day

DYNAMIKA TITRU PROTILÁTEK U JEHŇAT

Dynamika titru protilátek jehňat ve věku 12 až 30 týdnů je uvedena na obr. 2. Pokus jsme zahájili s 32 jehňaty a poslední dva odběry bylo v pokuse 27 a 24 jehňat. Ve věku 12—18 týdnů byla jehňata sérologicky negativní nebo měla pouze nízké hladiny specifických protilátek (do titru 80). V období 20—24 týdnů věku jehňat došlo k pozvolnému zvyšování počtu zvířat s protilátkovou odpovědí a výše zjišťovaných titrů vystoupila až na 320. Ve třetím období, tj. od 24. do 30. týdne věku jehňat se hladina protilátek výrazně zvýšila (titry až 5120) s maximem kolem 28. týdne. Statisticky vyjádřená dynamika titrů protilátek je znázorněna na obr. 3.

Hodnoty hematokritů zachycené podle věku jehňat jsou statisticky vyhodnoceny v tab. II. Z výsledků vyplývá, že s přibývajícím věkem dochází k pozvolnému zvyšování hodnot hematokritu (z 0,28 na 0,31). Po celou dobu sledování nejevila zvířata žádné klinické příznaky onemocnění sarkocystózou, a to ani v období intenzivní protilátkové odpovědi.

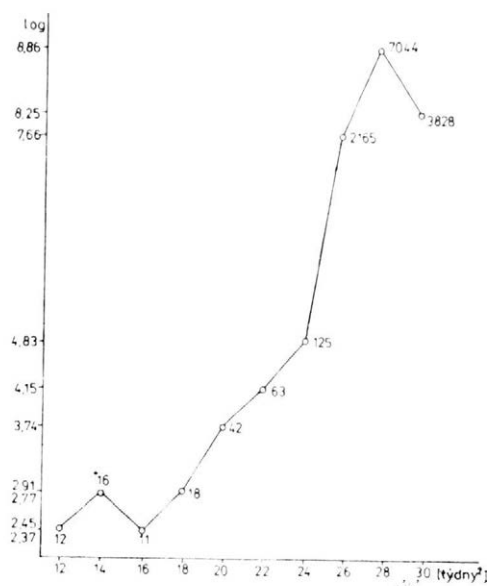
POSTMORTÁLNÍ PŘÍMÁ A NEPŘÍMÁ DIAGNOSTIKA SARKOCYSTÓZY

Přímými metodami jsme zachytili ve svalovině jícnu a bránice mikrocysty u 122 jehňat (35,67 %). Makrocysty nebyly zjištěny v žádném případě. Statistickým vyhodnocením získaných údajů jsme prokázali, že výskyt cyst se zvyšuje s věkem ($P < 0,005$). Zjistili jsme, že u mladých zvířat je bránice z testovaných orgánů místem s nejvyšší extenzitou výskytu cyst. Jen v bránici se cysty nacházely u 21,05 %, zatímco nálezy cyst jen v jícnu (5,26 %) a současně v jícnu a v bránici (9,36 %) lze u jehňat považovat za sporadické. Extenzitu a intenzitu výskytu sarkocyst v jícnu a bránici uvádí tab. III. U jehňat jsme nejčastěji nacházeli slabou invazi (+). Zjistili jsme, že s věkem přibývá významně ($P < 0,005$) záhytů na ++ až +++.

Titry protilátek¹

5120								19	26	13
2560								1	1	3
1280								1		5
640								3		3
320							3			
160					9	2	7			
80		1		5	1	10	15	7		
40				1	4	10	5			
20		6	1	4	4	9				
10	14	17	3	2	4					
0	18	7	27	19	9		1			
	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
									Věk (týdny) ²	

2. Dynamika titrů protilátek u odstavených jehňat (NFR — četnost titrů) — Dynamics of the titres of antibodies in weaned lambs (NFR — titre rate)
¹titres of antibodies, ²age (weeks)



3. Dynamika titrů protilátek u odstavených jehňat (statistické vyhodnocení) — Dynamics of the titres of antibodies in weaned lambs (statistic evaluation)
 * = průměrný titr protilátek získaný odlogaritmováním — mean titre of antibodies obtained by finding the antilogarithm
¹age, ²weeks

Specifické protilátky proti sarkocystóze byly zjištěny u 323 jehňat (94,44 %). Nejvyšší hladiny protilátek od titru 1 280—10 240 byly u 124 kusů (34,6 %).

Srovnání obou diagnostických metod uvádí tab. IV. Vyplývá z ní, že na vysoké diskrepanci výsledků obou metod (61,69 %) se podílí častý záchyt protilátek, který nebyl doprovázen přímým průkazem sarkocyst.

II. Hodnoty hematokritu jehňat v průběhu sledování — The haematocrit values of lambs within the course of studying

Kategorie ¹		Věk jehňat (datum odběru) ⁶		
		18 týdnů ⁷ (19. 3. 87)	26 týdnů ⁸ (14. 5. 87)	30 týdnů ⁹ (18. 6. 87)
Počet vyšetřených jehňat ²	(n)	31	31	24
Aritmetický průměr ³	($\bar{x}$)	0,281	0,283	0,309
Směrodatná odchylka ⁴	(s)	0,039	0,024	0,021
Variační koeficient ⁵	(V)	13,843	8,539	6,845

¹category, ²number of examined lambs, ³arithmetical mean, ⁴standard deviation, ⁵coefficient of variation, ⁶the age of lambs [the date of sampling], ⁷18 weeks, ⁸26 weeks, ⁹30 weeks

III. Extenzita a intenzita výskytu cyst — The extensivity and intensity of the occurrence of cysts

Intenzita výskytu cyst ¹	Pozitivní nálezy ¹⁰	
	počet ¹¹	%
Jícen ²		
Slabá ³ (*)	45	29,22
Střední ⁴ (**)	4	2,60
Silná ⁵ (***)	1	0,65
Jícen celkem ⁶	50	32,47
Bránice ⁷		
Slabá ³ (*)	89	57,79
Střední ⁴ (**)	9	5,84
Silná ⁵ (***)	6	3,90
Bránice celkem ⁸	104	67,53
Celkem ⁹	154	100,00

¹intensity of cyst occurrence, ²gullet, ³weak, ⁴medium, ⁵strong, ⁶gullet as a whole, ⁷diaphragm, ⁸diaphragm as a whole, ¹⁰positive findings, ¹¹number

IV. Srovnání přímého průkazu sarkocyst s výsledky nepřímé imunofluorescenční reakce — The comparison of direct evidence of sarcocysts with the results of indirect immunofluorescent reaction

Vyšetřovací metoda (výsledek) ¹		Jehňata ²	
Přímé vyšetření ³	NFR ⁴	počet ⁵	%
(-)	(-)	14	4,10
(+)	(-)	5	1,46
(-)	(+)	206	60,23
Celkem jedna reakce pozitivní ⁶		211	61,69
(+)	(+)	117	34,21
Celkem vyšetřeno zvířat ⁷		342	100,00

¹method of examination (results), ²lambs, ³direct examination, ⁴indirect immunofluorescent reaction (NFR), ⁵number, ⁶as a whole one positive reaction, ⁷animals examined total

Ovce jsou v našich podmínkách mezihostitelem tří druhů rodu *Sarcocystis*. Jejich definitivním hostitelem jsou psovitě a kočkovitě šelmy. Vzhledem k těsnému soužití těchto živočišných druhů je sarkocystóza velmi rozšířená. Extenzita výskytu se liší nejen v závislosti na geografických podmínkách a použitých diagnostických metodách, ale projevuje se výrazná závislost na věku zvířat.

Výskyt svalových cyst jsme zaznamenali pouze u 35,67 % jehňat. Výsledek ukazuje, že extenzita sarkocyst se výrazně zvyšuje s věkem zvířat ($P < 0,005$), což je v souladu s pozorováními autorů Herbert a Smith (1987), ale také našimi závěry (Svobodová, 1989). Jehňata se obvykle nakazí až v počátcích příjmu objemného krmiva, které je často kontaminováno sporocystami rodu *Sarcocystis*. První svalové cysty můžeme pozorovat až za tři měsíce po nakažení (Leek aj., 1977; O'Toole aj., 1986). Ve svalovině bránice jsme cysty u jehňat nacházeli častěji. Druhy tvořící mikrocyty mají k bránici vyšší afinitu (Heydorn aj., 1975). Naproti tomu *S. gigantea*, charakteristická tvorbou makrocyst, se lokalizuje častěji v jícnu (Collins aj., 1979), ale u mladých zvířat zpravidla neurčíme teprve se formující svalové cysty. Zralé makrocysty jsme u jehňat nezjistili vzhledem k dlouhé době jejich vývoje.

Sarkocysty jsme nacházeli nejčastěji ve slabé invazi (+), neboť i intenzita se signifikantně zvyšuje s věkem zvířat ($P < 0,005$). Častějšímu výskytu mikrocyt odpovídá i vyšší nález sporocyst *Sarcocystis* sp. v trusu psů ve srovnání s kočkami (Svobodová aj., 1983, 1984). Diagnostika sarkocystózy u jehňat nemůže spoléhat pouze na adspekci, ale je třeba použít mikroskopické vyšetření svaloviny.

Sérologickým vyšetřením NFR jsme zachytili větší počet pozitivních zvířat než přímým průkazem sarkocyst. Specifické protilátky proti sarkocystóze jsme diagnostikovali u 94,4 % jehňat. U 112 zvířat (34,6 %) jsme nacházeli vysoké titry protilátek (1 280 až 10 240) svědčící o akutní infekci. Výrazný rozdíl mezi přímým průkazem sarkocyst a přítomností protilátek u mladých zvířat je způsobený dynamickou diskrepancí spočívající v tvorbě protilátek v počátcích infekce, kdy se ještě nevyvinuly diagnostikovatelné svalové cysty. Diskrepance u 61,69 % jehňat ukazuje, že k vytvoření celkového obrazu promořenosti sarkocystózou musíme při diagnostice u mladých zvířat nezbytně využít vhodnou sérologickou metodu.

Prvním pokusem jsme prokázali, že jehňata nejsou na počátku svého života chráněna proti této parazitóze. V krevním séru bahnic zjišťujeme specifické protilátky proti sarkocystóze, ale k jejich přenosu na jehňata během březosti nedochází. Teprve po napití mleziva, které obsahuje vysoké hladiny protilátek proti sarkocystóze, se v krevním séru jehňat objevují nízké hladiny, které byly získány z kolostra. Munday (1982) zjistil, že jehňata získávají protilátky proti sarkocystóze z mleziva matek, ale pasívně získané protilátky nechrání jehňata před nakažením. Tento názor potvrzuje i námi sledovaná dynamika titru protilátek u jehňat, kdy nebyly zaznamenány významné rozdíly v protilátkové odpovědi mezi jehňaty s reziduálními kolostrálními protilátkami a bez protilátek. Od 18. týdne věku zvířat jsme pozorovali mírný vzestup protilátek a mezi 24. a 26. týdnem života jehňat došlo k prudkému vze-

stupu a tato hladina s mírným poklesem přetrvávala až do ukončení pokusu. Černá a Kolářová (1978) uvádějí, že největší protilátková odpověď je v období formování svalových cyst. Z toho vyplývá, že jehňata v našem pokusu se nakazila asi kolem 20. týdne života. Rozdílná výška titru u jednotlivých zvířat souvisela spíše s různou schopností imunitní odpovědi, než s invazní dávkou, která podle autorů Reiter aj. (1981) nemá vliv na tvorbu protilátek. Ani v období maximálního vzestupu hladiny specifických protilátek nejevila zvířata žádné klinické příznaky akutního onemocnění. Ve věku 20 týdnů je již obranyschopnost organismu rozvinuta a onemocnění se klinicky neprojeví (Munday, 1984). I když hodnoty hematokritu byly poněkud nižší než uvádějí Jagoš aj. (1986), není třeba význam těchto rozdílů přeceňovat. Patrně se zde uplatnily různé podmínky chovu a stupně hydratace organismu. Je nutné si uvědomit, že klinické příznaky sarkocystózy jsou nespecifické a domníváme se, že toto onemocnění se může projevit i v našich podmínkách, ale v důsledku náročnější diagnostiky se skrývá za jinou nosologickou jednotkou s podobnými symptomy (horečka, průjem, anémie, hubnutí). Na tuto možnost upozorňuje také Černá (1989).

Jehňata se nakazí sporocystami kontaminujícími prostředí stáje, seno apod. S ohledem k vysoké odolnosti sporocyst ve vnějším prostředí (Leek, 1986) a běžnému kontaktu s definitivními hostiteli je velmi problematické tomuto cyklu zamezit. Obdobné podmínky předpokládáme na ostatních farmách, neboť při vyšetření jehňat porážených na jatkách jsme nacházeli rovněž vysoké titry protilátek proti sarkocystóze.

Literatura

- COLLINS, G. H. — ATKINSON, E. — CHARLESTON, W. A. G.: Studies on *Sarcocystis* species III. The macrocysts species of sheep. N. Z. veter. J., 27, 1979, s. 204—206.
- ČERNÁ, Z.: K otázce diagnostiky sarkosporidií a jejich významu ve veterinární medicíně. Veterinářství, 39, 1989, s. 449—450.
- ČERNÁ, Z. — KOLÁŘOVÁ, J.: Contribution to the serological diagnosis of *Sarcocystis*. Folia Parazit. (Praha), 25, 1978, s. 289—292.
- ČERNÁ, Z. — MERHAUTOVÁ, V.: *Sarcocystis* in cattle and sheep at Prague abattoir. Folia Parazit. (Praha), 28, 1981, s. 125—129.
- DUBEY, J. P. — LEEK, R. G. — FAYER, R.: Prevalence, transmission, and pathogenicity of *S. gigantea* od sheep. J. A. V. M. A., 188, 1986, č. 2.
- GUT, J.: Effectiveness of methods used for the detection of Sarcosporidiosis in farm animals. Folia Parazit. (Praha), 29, 1982, s. 289—295.
- HAMILTON, M. A. — RINALDI, M. G.: Descriptive statistical analyses of serial dilution data. Statist. Med., 7, 1988, s. 535—544.
- HERBERT, J. V. — SMITH, T. S.: *Sarcocystis*. Parasitol. Today, 3, 1987, s. 16—21.
- HEYDORN, A. O. — GESTRICH, V. R. — MEHLHORN, H. — ROMMEL, M.: Proposal for a new nomenclature of the Sarcosporidiosis. Z. Parasitenkunde, 48, 1975, s. 73—82.
- HILGENFELD, M. — PUNKE, G.: Zur Sarkosporidieninfektion des Zentralnervensystems des Schafes, ein Beitrag zur Differentialdiagnose von Protozoeninfektionen. Arch. exp. Veter.-Med., 28, 1974, s. 621—626.
- JAGOŠ, P. — STRÍŽ, J. — VALACH, Z.: Choroby ovcí. Brno, VŠV [skripta], 1986.
- LANDSVERK, E. R. — BRATBERG, B.: *Polyarteritis nodosa* associated with *Sarcocystis* in a lamb. Acta veter. scand., 20, 1979, s. 306—308.
- LEEK, R. G.: Infection of sheep with frozen sporocysts of *S. ovis*. Proc. Helminth. Soc. Wash., 53, 1986, s. 297—298.
- LEEK, R. G. — FAYER, R. — JOHNSON, A. J.: Sheep experimentally infected with Sporocysts from dogs. I. Disease in young lambs. J. Parasit., 63, 1977, s. 642—650.
- MORGAN, G. — TERLECKI, S. — BRADLEY, R.: A suspected case of sarcocystosis encephalitis in Sheep. Brit. veter. J., 140, 1984, s. 64—69.
- MUNDAY, B. L.: The effect of *S. ovis* on growth rate and hematocrit in lambs. Veter. Parasit., 5, 1979, s. 129—135.

- MUNDAY, B. L.: Effects of preparturient inoculation of pregnant ewes with *S. ovis* upon the susceptibility of their progeny. *Veter. Parasit.*, 9, 1982, s. 273—276.
- MUNDAY, B. L.: The effect of *Sarcocystis tenella* on wool growth in sheep. *Veter. Parasit.*, 15, 1984, s. 91—94.
- NEVOLE, M. — LUKEŠOVÁ, D.: Metody přímé detekce sarkocyst a jejich diagnostická spolehlivost. *Veter. Med. (Praha)*, 26, 1981, s. 581—584.
- O'TOOLE, D. — DUFFELL, S. J. — UPCOTT, D. N. — FREVIN, D.: Experimental microcyst sarcocystis infection in lambs: Pathology. *Veter. Rec.*, 119, 1986, s. 526—531.
- REITER, J. — WEILAND, G. — ROSCHER, B. — MEYER, J. — FRAHM, K.: Studies on the serological diagnosis of experimentally induced bovine and ovine sarcocystosis. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, 94, 1981, s. 425—430.
- STUBBINGS, D. P. — JEFFREY, M.: Presumptive protozoan (sarcocystis) encephalomyelitis with paresis in lambs. *Veter. Rec.*, 116, 1985, s. 373—374.
- SVOBODOVÁ, V.: Sarkocystóza ovcí. [Kandidátská disertace.] Brno 1989, 123 s. — Vysoká škola veterinární.
- SVOBODOVÁ, V. — NEVOLE, M.: Sarkocystóza jatečných ovcí. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985, s. 675—679.
- SVOBODOVÁ, V. — NEVOLE, M. — ŠIMEČKOVÁ, A.: Kokcidie u koček v brněnské oblasti. *Veterinářství*, 35, 1983, s. 517—519.
- SVOBODOVÁ, V. — SVOBODA, M. — NEVOLE, M.: Výskyt kokcií u psů z Brna a okolí. *Veter. Med. (Praha)*, 29, 1984, s. 627—632.
- TADROS, W. — LAARMAN, J. J.: Sarcosporidiosis and sarcocystis — induces coccidiosis. *Adv. Parasit.*, 20, 1982.

Došlo dne 17. 4. 1990

SVOBODOVÁ, V. [University of Veterinary Medicine, Brno]: *Sarcocystosis of lambs*. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991 (4): 235—243.

We studied the problems of sarcocystosis of lambs in regard to the transfer of antibodies over ewes to lambs. Antibodies in the blood serum of 26 ewes found out by help of indirect immunofluorescent reaction (NFR) varied within the range from 640 to 5120 titres, while in six cases their level was higher than in blood. In none of new-born lambs there were proved antibodies to the sarcocystosis before the drinking of colostrum but three days later we already detected antibodies in the dilution 1:4 to 1:128. Then we studied the titre dynamics of antibodies in weaned lambs. In the age of 10—18 weeks we proved only low titres of antibodies, from the 20th to the 24th weeks the titres gradually increased and from the 26th to the 30th weeks the level of antibodies increased significantly (5120 titres) with its maximum on about the 28th week. Animals had no clinic symptoms of disease. In the other part of the work we examined the muscular substance of 342 lambs, killed in the slaughter house, by a digestive method and we carried out the blood serologic examination (NFR). Microcysts were found out in 35.67 % of lambs while macrocysts were so in none of them. Specific antibodies of sarcocystosis were detected in 94.44 % of young animals. A high discrepancy of the both methods (61.69 %) in young animals is a result of a significant antibody reaction at still undeveloped muscular cysts.

sheep; transfer on antibodies; muscular cysts; dynamics of the titre of antibodies

Adresa autorky:

MVDr. Vlasta S v o b o d o v á, Vysoká škola veterinární, Palackého 1—3, 612 42 Brno

Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství pobočka
Nitra vydává nový odborný časopis o alternativním zemědělství

NATURALIS

Jde o odborný časopis, který má v ČSFR podpořit snahy o produkci zdravých potravin a racionální výživu. Je určen pro pěstitele rostlin, chovatele hospodářských zvířat, obchodníky, zpracovatele a samozřejmě konzumenty biopotravin.

Vychází jako dvouměsíčník; v roce 1991 vyjdou tři čísla a v roce 1992 již šest čísel. Cena jednoho výtisku 11 Kčs.

Dále vydává ve spolupráci s redakcí AGSAMO odborný časopis

CHOV SLIMÁKOV

Časopis poskytuje domácí i zahraniční informace z oblasti chovu hlemýžďů a zpracování jejich masa. Jeho dalším cílem je přispět k podpoře chovatelských snah z hlediska životního prostředí a k urychlenému schválení zákona o ochraně živočišného druhu hlemýžď zahradní (*Helix pomatia*) na celém území ČSFR. Časopis je určen všem, kteří se zabývají chovem, zpracováním a managementem hlemýžďů.

Vychází jako dvouměsíčník, roční předplatné je 50 Kčs.

Objednávky na oba časopisy zasílejte na adresu:

Ústav vědeckotechnických informací pre poľnohospodárstvo pobočka Nitra
Samova 9
950 10 Nitra

J. Ruprich, V. Ostrý

RUPRICH, J. — OSTRÝ, V. [Institut hygieny a epidemiologie, Brno]: *Enzymoimunologické stanovení mykotoxinu ochratoxin A*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (4): 245—249.

Bylo rozpracováno nepřímé, enzymoimunologické stanovení mykotoxinu ochratoxin A. Ve stanovení byla použita polyklonální protilátka (králíčí) proti ochratoxinu A a druhá, peroxidázou značená protilátka (prasečí anti králíčí). Citlivost stanovení se pohybovala okolo 75 pg ochratoxinu A na jamku. Rozsah kalibrační křivky byl mezi 10—1000 pg na jamku. Křížové reakce s jinými ochratoxiny byly do 1,4 % (ochratoxin C). ELISA stanovení ochratoxinu A je použitelné jako rychlá screeningová metoda pro orientační vyšetření většího počtu vzorků.

ELISA; mykotoxiny; ochratoxin A

Mykotoxin ochratoxin A (OA) je sekundární metabolit některých mikroskopických hub (plísní) rodu *Aspergillus* a *Penicillium* (Krogh, 1978). Z chemického hlediska se jedná o derivát kumarinu kondenzovaný s L-beta-fenylalaninem. Jeho toxikologický význam je dán negativním vlivem na zdravotní stav zvířat a člověka. Je potenciálním nefrotoxinem a hepatotoxinem, závažný je i jeho imunosupresní, teratogenní a možný karcinogenní účinek (Rosenthaler aj., 1984; Bauer, 1987).

V ČR byl prokázán jeho výskyt v řadě krmiv a potravin rostlinného i živočišného původu (Veselá aj., 1978; Pískač aj., 1979; Ruprich aj., 1988b). Množství ochratoxinu A v potravinách je v ČR limitováno hygienickými předpisy (Sv. 61/1986, Sm. č. 69), a to 20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ obecně, 5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ u dětské výživy, 1 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ u kojenecké výživy. Po zvážení negativních efektů ochratoxinu A při výpočtu denní přípustné dávky (ADI) byl (při běžné skladbě výživy) doporučen limit obsahu ochratoxinu A v 1 kg masa na 1,2 ng (Bauer aj., 1987). Požadavky na vysokou citlivost analytických metod jsou proto značné.

Využívány jsou především metody chromatografické (TLC, HPLC). Použity však byly i citlivé metody immunochemické, RIA (Chu aj., 1976; Rousseau aj., 1985, 1986; Ruprich aj., 1988a) a ELISA (Pestka aj., 1981; Morgan aj., 1983; Lee aj., 1984; Candlich aj., 1986, 1988). V ČR byla dosud využívána pouze metoda RIA (soupravu vyrábí ÚRVJT Košice).

Cílem naší práce bylo ověřit možnost nepřímého, kompetitivního ELISA stanovení ochratoxinu A, s využitím některých komponent připravených již dříve pro RIA stanovení.

MATERIÁL A METODY

Použité chemikálie: Ochratoxin A [připravený metodou podle autorů Ruprich aj. (1987), ochratoxin A (Sigma 0-04001), ochratoxin B, ochratoxin alfa, ochratoxin C (připravili a laskavě poskytli Vereš a Schmiedová z ÚNBR MBÚ ČSAV Praha), aflatoxin B₁ (Sigma A 6636), citrinin (připravil Ruprich, 1988b, CHPŘ Brno), L-beta-fenylalanin a D-beta-fenylalanin (Serva 32191 a 32140), 1-etyl-3 [3-dimetylamino-propyl] carbodiimid (Sigma E-7750), bovinní sérový albumin (BSA) (Sigma A-7888), bovinní sérový albumin (Imuna), vaječný albumin (EGA) (Sigma A-5503), gelatin (Serva 22151), Tween 80 (Lachema) a další běžné chemikálie.

Příprava proteinových konjugátů OA: Ochratoxin byl konjugován s BSA, resp. s EGA, carbodiimidovou metodou nebo metodou smíšeného anhydridu (Ruprich aj., 1988b). Výsledný produkt reakce byl čištěn dialýzou (Nadir, Hoechst 5623245) a gelovou chromatografií (Sephadex LH 20, Pharmacia). Čistý konjugát byl charakterizován spektrálně a morálně poměr byl kontrolován ninhydrinovou metodou. Dosažený molární poměr se u konjugátů pohyboval okolo 10 až 20:1 (ochratoxin A:albumin). Konjugát rozpuštěný ve fosfátovém pufru (pH = 7,5; 0,05 mol. dm⁻³) byl konzervován přidavkem 0,1 % azidu sodného a uchováván v temnu při teplotě 4 °C. V případě použití konjugátu k imunizaci byl roztok lyofilizován bez přidavku azidu.

Příprava protilátek proti OA: K imunizaci jsme využili konjugát OA-EGA. Jako adjuvans byl použit Al-Span-Oil (Sevac). Imunizace byla provedena metodou mnohočetné intradermální a následně subkutánní a intramuskulární aplikace imunogenu (Ruprich aj., 1988a). K imunizaci byly použity králíci (samice) plemene novozélandský bílý. Hyperimunní sérum králíků bylo lyofilizováno, charakterizováno RIA metodou (Ruprich aj., 1988a) a použito v ELISA jako zdroj specifické protilátky proti ochratoxinu A (první protilátka).

Příprava mikrotitračních ploten pro ELISA: Byly použity plotny Koh-I-Noor, typ P (Koh-I-Noor). Plotny byly před použitím myty 96% etanolem. Stěny jamek byly povlečeny konjugátem OA-BSA. K vazbě jsme použili uhlíčitany, alkalický vazebný roztok (pH = 9,6; Mančal, 1987), ve kterém byl přidán konjugát v množství 3 µg bílkoviny. ml⁻¹, v množství 200 µl na jamku. Plotny byly inkubovány 1 h při teplotě 40 °C nebo 3 h při teplotě 28 °C. Po inkubaci byl vazebný roztok odsát a plotna byla opakovaně myta roztokem 0,15 mol NaCl. l⁻¹ s přidavkem 0,1 % Tweenu 80. Plotny byly po mytí sušeny při pokojové teplotě ve vakuu. Suché plotny byly zataveny do polyetylenové fólie a skladovány při pokojové teplotě v temnu a suchu až do použití. Trvanlivost ploten byla vyšší než tři měsíce (déle jsme plotny neskladovali).

ELISA postup: Plotna povlečená konjugátem OA-BSA byla vyjmuta z obalu a jedenkrát myta roztokem NaCl — Tween. Do jamek byl v triplicátech nebo quadruplicátech přidán standard ochratoxinu A (nebo vzorek) v množství 100 µl na jamku. Standard (nebo vzorek) byl rozpuštěn v metanolu a naředěn na 10 % podílu v pufru PBS (pH = 7,4; Mančal, 1987), s přidavkem 0,5 % gelatinu a 0,1 % Tweenu 80. Pufr byl konzervován merthiolátem sodným. Pro usnadnění pipetování byl pufr obarven přidavkem fenolové červeně (4 mg. l⁻¹). Ve stejném pufru (bez přidavku metanolu) byla do jamek přidána i protilátka proti OA, v množství 100 µl a ředění 1 : 10 000. Plotny byly inkubovány 1 h při teplotě 40 °C. Následovalo trojnásobné mytí roztokem NaCl — Tween. Pak bylo do jamek přidáno 200 µl roztoku peroxidázou značené prasečí protilátky proti králíčímu imunoglobulinu (SwAR/Px; ÚSOL), v ředění 1 : 5000. K ředění byl použit pufr TRIS (pH = 7,2; Mančal, 1987) s přidavkem 1 % BSA, 1 % prasečího séra a 0,1 % Tweenu 80. Plotny s druhou protilátkou byly inkubovány 1 h při teplotě 40 °C. Následovalo trojnásobné mytí ploten roztokem NaCl — Tween. Do všech jamek pak bylo přidáno 200 µl čerstvě připraveného roztoku substrátu [1,4 diaminobenzen. HCl, Fluka 78460, optimum absorpce barevného produktu při 492 nm) v substrátovém pufru (citrátový pufr, pH = 5,0; Mančal, 1987). Plotny byly inkubovány 30 min při teplotě 40 °C v temnu. Enzymatická reakce byla pak zastavena přidavkem 50 µl 2 mol H₂SO₄. l⁻¹ na jamku. Zbarvení bylo hodnoceno vizuálně nebo fotometricky (fotometr Multiscan MC, Labsystem OY) do 1 h po zastavení reakce. Výsledky stanovení (fotometrické) byly zpracovány pomocí programu KIM (ÚSOL).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Princip popisované ELISA metody stanovení ochratoxinu A spočívá v soutěži vazby ochratoxinu A ze vzorku (standardu) a ochratoxinu A

fixovaného konjugátem (OA-BSA) na stěně jamky na specifickou protilátku. Po odstranění zbytků reakční směsi je kvantifikována specifická protilátka proti OA navázaná na stěnách jamek pomocí druhé protilátky (SwaR/Px) značené enzymem. Množství ochratoxinu A ve vzorku je tedy nepřímo úměrné množství vázané první protilátky (proti OA). Princip není nový, s úspěchem jej použili např. Morgan aj. (1983) nebo C andlish aj. (1986). V našem případě byl použit odlišný bílkovinný nosič OA — vaječný albumin a odlišná druhá protilátka (SwaR/Px).

Připravené protilátky proti OA byly testovány z hlediska křížových reakcí, homogenity a efektivní afinitní konstanty. Výsledky křížových reakcí s příbuznými ligandy a některými dalšími mykotoxiny u vybrané protilátky použité pro ELISA stanovení (AB-887) shrnuje tab. I.

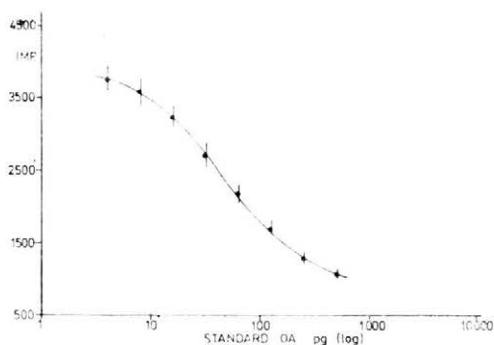
Údaje týkající se křížových reakcí jsou příznivé z hlediska praktického použití protilátky. V podstatě nedochází k reakci s méně toxickým ochratoxinem B ani ochratoxinem alfa. Rovněž často ochratoxin A doprovázející mykotoxin, citrinin s protilátkou výrazně nereaguje. Protilátka významně nereaguje ani s produkty enzymatického štěpení ochratoxinu A karboxypeptidázou. V RIA stanovení (Ruprich aj., 1988a) byla stanovena homogenita použité protilátky na alfa — 1,01, což je příznivé. V tomtéž stanovení byla určena efektivní afinitní konstanta protilátky $K_a = 5,2 \cdot 10^{-9} \text{ l. mol}^{-1}$. To umožňuje dosáhnout ve stanovení potřebné citlivosti. Kalibrační křivka z RIA stanovení je znázorněna na obr. 1.

Provedení celého ELISA postupu trvá asi tři až čtyři hodiny. Na jedné plotně je možné vyšetřit současně 10—20 vzorků. Příklad kalibrační křivky ELISA stanovení OA je na obr. 2. Jak je z obr. patrné činí rozsah kalibrační křivky, jež lze použít pro odečítání, asi 10—1000 pg ochratoxinu A na jamku. Pozadí barevné reakce (tj. bez přídavku první protilátky) se pohybuje okolo 10 % optické denzity nulového standardu. Statisticky určená citlivost metody (tj. O. D. nulového standardu —3 směrodatné odchylky) se pohybuje mezi 50—100 pg na jamku. Relativně nízká citlivost je podmíněna poměrně vysokým variačním koeficientem mezi jednotlivými jamkami (okolo 10 %), což považujeme z části za důsledek jednoduchého technického vybavení laboratoře a kvality použitých ploten.

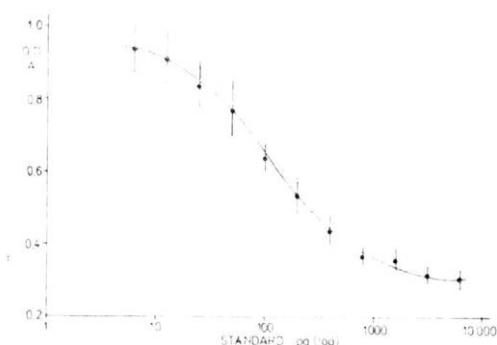
I. Křížové reakce protilátky AB 887 (anti ochratoxin A-EGA) v RIA a ELISA stanovení. (RIA metoda podle autorů Ruprich aj., 1988) — The cross reactions of antibody AB 887 (anti ochratoxin A-EGA) in the RIA and ELISA techniques. (The RIA method in after Ruprich et al., 1988)

Ligand ¹	Křížová reakce ² [%]	
	RIA	ELISA
Ochratoxin A	100	100
Ochratoxin B	0,7	0,01
Ochratoxin alfa	6,1	0,03
Ochratoxin C	—	1,4
L-beta-fenylalanin	<0,001	<0,0004
D-beta-fenylalanin	<0,001	<0,0004
Citrinin	<0,4	<0,003
Aflatoxin B1	<0,4	<0,003

¹ligand, ²cross reaction



1. Kalibrační křivka RIA stanovení ochratoxinu A [kalibrační body = průměr $\pm$ směrodatná odchylka; AB — 887, OCH- I^{125} , separace 1,5% dextr. Norit A, noční inkubace] — RIA calibration curve of ochratoxin A [calibration points = mean $\pm$ standard deviation; AB — 887, OCH- I^{125} , 1.5% dextr. separation. Norit A, night incubation]



2. Kalibrační křivka ELISA stanovení ochratoxinu A [kalibrační body = průměr $\pm$ směrodatná odchylka; AB1-887, AB2-SWAR/Px, OPD, O. D. (A) 510 nm] — ELISA calibration curve of ochratoxin A [calibration points = mean $\pm$ standard deviation; AB1-887, AB2-SWAR/Px, OPD, O. D. (A) 510 nm]

Stejné podmínky lze však očekávat při použití ELISA v terénních laboratořích. I v citlivosti je však popisována metoda plně srovnatelná se zahraničními citovanými pracemi. V daném provedení měla ELISA menší rozlišovací schopnost proti RIA (Ruprich aj., 1988a).

V daném uspořádání je problematická optimalizace ELISA stanovení. Pokud vyhodnocujeme stanovení vizuálně, je potřeba dosáhnout výraznějšího vybarvení v jamkách. To však není možné odečítat přímo na fotometru, protože intenzita vybarvení přesahuje měřicí rozsah přístroje. Volili jsme proto kompromis. Pro vizuální odečítání byla použita vyšší koncentrace reagujících složek v kompetiční části ELISA reakce (zejména zvýšené koncentrace první protilátky) a při fotometrickém hodnocení pak odečítání optické denzity mimo absorpční maximum barevného produktu.

Problém spontánní vazby ochratoxinu A na albumin (Rosenthaler aj., 1984), jsme řešili náhradou BSA v pufru použitým v kompetiční části reakce, za gelatin. Ke konzervaci pufrů byl použit merthiolát sodný (azid sodný inhibuje peroxidázu).

Při koncipování ELISA metody stanovení ochratoxinu A jsme se snažili využívat běžně dostupné chemikálie a laboratorní techniku. Většina pufrů odpovídá jiným ELISA metodám (Mancal, 1987). Druhá protilátka je běžně dostupná v ÚSOL Praha, dosahuje dobré kvality a stability (životnost přes jeden rok). Metoda ELISA je použitelná i v terénních laboratořích bez zvýšených hygienických nároků. Díky dlouhé životnosti konjugátů a protilátek a nízké spotřebě základních komponent stanovení je cenově výhodnější než RIA metoda. Velkým pozitivem je možnost vizuálního hodnocení. Na druhé straně je nutné vzít v úvahu nižší přesnost ELISA stanovení ve srovnání s fyzikálně chemickými metodami. Ideálním místem pro využití ELISA metody bude hromadná, orientační kontrola krmiv a potravin. Může se stát i vhodným nástrojem pro orientační kontrolu surovin před jejich nákupem v zahraničí. Jedním z limitujících

faktorů pro použití ELISA metody zůstává adekvátní příprava vzorků pro stanovení. V tomto směru se jako výhodné jeví použití mikrokolonek typu SILICA-cart C18 (Tessek).

Literatura

- BAUER, J. — GRIES, M.: Ochratoxin A in Nahrungsmittelkette. J. Veter. Med., 34, 1987, s. 613—627.
- CANDLISH, A. A. G. — STIMSON, W. H. — SMITH, J. E.: A monoclonal antibody to ochratoxin A. Letters in Applied Microbiology, 3, 1986, s. 9—11.
- CANDLISH, A. A. G. — STIMSON, W. H. — SMITH, J. E.: Determination of ochratoxin A by monoclonal antibody-based enzyme immunoassay. J. Assoc. off. analyt. Chem., 71, 1988, s. 961—964.
- CHU, F. S. — CHANG, F. C. — HINSDELL, R. D.: Production of antibody against ochratoxin A. Appl. Environ. Microbiol., 31, 1976, s. 831—835.
- KROGH, P.: Causal associations of mycotoxic nephropathy. Acta path. microbiol. Scand., Sect. A, suppl. 269, 1978, 28 s.
- LEE, S. C. — CHU, F. S.: Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in wheat. J. Assoc. off. analyt. Chem., 67, 1984, s. 45—49.
- MANČAL, P.: Metody enzymové imunoanalýzy. Praha ÚSOL, 1987, 83 s.
- MORGAN, M. R. A. — MCNERNEY, R. — CHAN, H. W. S.: Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in barley. J. Assoc. off. analyt. Chem., 66, 1983, s. 1481—1484.
- PESTKA, J. J. — STEINERT, B. W. — CHU, F. S.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of ochratoxin A in serum. J. agric. fd. Chem., 41, 1981, s. 1472—1474.
- PISKAČ, A. aj.: Mykotoxická nefropatie prasat ve velkochovech. Veterinářství, 29, 1979, s. 253—255.
- ROSCHENTHALER, R. — CREPPY, E. E. — DIRHEIMER, G.: Ochratoxin A: on the mode of action of a ubiquitous mycotoxin. J. Toxicol. — Toxin Rev., 3, 1984, s. 53—86.
- ROUSSEAU, D. M. — SLEGERS, G. A. — VANPETEGHEM, C. H.: Radioimmunoassay of ochratoxin A in barley. Appl. Environ. Microbiol., 40, 1985, s. 529—531.
- ROUSSEAU, D. M. — SLEGERS, G. A. — VANPETEGHEM, C. H.: Solid-phase radioimmunoassay of ochratoxin A in serum. J. agric. fd. Chem., 34, 1986, s. 862—865.
- RUPRICH, J. — PISKAČ, A.: Příprava mykotoxinu ochratoxin A k významným a diagnostickým účelům. Veter. Med. (Praha), 32, 1987, s. 675—680.
- RUPRICH, J. — PISKAČ, A. — MALÁ, J.: Použití radioimunologického stanovení mykotoxinu ochratoxin A ke screeningové kontrole potravin a krmiv rostlinného původu — typu obilovin. Veter. Med. (Praha), 33, 1988a, s. 165—173.
- RUPRICH, J. — VEREŠ, K. — SCHMIEDOVÁ, D.: Radioimunologické stanovení mykotoxinu ochratoxin A — nová diagnostická metoda v ČSSR. Veter. Med. (Praha), 33, 1988b, s. 101—108.
- VESELÁ, D. — VESELÝ, D. — JELÍNEK, S. — KUSÁK, V.: Nález ochratoxinu A v krmném ječmeni. Veter. Med. (Praha), 23, 1978, s. 431—436.

Došlo dne 27. 3. 1990

RUPRICH, J. — OSTRÝ, V. (Institute of Hygiene and Epidemiology, Brno): *Enzymo-immunological assays of the mycotoxin ochratoxin A*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (4): 245—249.

Indirect, enzymeimmunoassays of the mycotoxin ochratoxin A were developed. In this technique a polyclonal (rabbit) antibody to ochratoxin A was used, along with the other, peroxidase-labelled (pig anti rabbit) antibody. The sensitivity of this method ranged around 75 pg of ochratoxin A per pit. The range of calibration curve was from 10 to 1000 pg per pit. The cross reactions with other ochratoxins made 1.4 % (ochratoxin C). The ELISA test of ochratoxin A can be used as an expeditious screening method for a preliminary examination of the greater number of samples.

ELISA; mycotoxins; ochratoxin A

Adresa autorů:

MVDr. Jan Ruprich, CSc., MVDr. Václav Ostrý, CSc., Institut hygieny a epidemiologie. Palackého 1—3, 612 42 Brno

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 5/91 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny tyto příspěvky:

R. Doležel, L. Groch, E. Kudláč: Mikroskopické změny v interkarunkulárním endometriu a ovariálních folikulech u krav v průběhu 35 dnů po porodu

R. Doležel, E. Kudláč, B. Studenčík, J. Balšatík: Biochemické změny v periferní krvi krav v průběhu 45 dnů po porodu

B. Vojtíšek, B. Hronová, J. Hamřík, V. Jambor, V. Zezula, I. Zendulka, R. Dvořák, M. Šišák: Vliv jatelotravní siláže vyrobené s kyselinou akrylovou na vybrané ukazatele metabolismu krav v době kolem porodu a stav u jejich telat

M. Kudweis, Z. Lojda, I. Juliš, L. Lenhardt, J. Marcaník: Syntéza glukózo-6-fosfatázy sliznice tenkého střeva během experimentální kokcidiózy sajících selat

I. Jelenová: Vliv teploty a relativní vlhkosti na přežívání vajíček tasemnice *Moniezia expansa* (Rudolphi, 1810)

V. Kraus, A. Gomboš, N. Dušek: Cholinergická inervácia vajíčkovodu kráľíka

M. Snášil ml., L. Němeček, J. Mezerová: Ověření československého ventilátoru Elvent pro řízenou ventilaci při inhalační narkóze u psa

M. Snášil ml., L. Němeček, J. Mezerová: Změny klinických, hematologických a biochemických ukazatelů při řízeném dýchání během narkózy u psa

P. Řezáč, K. Blažek: Patologické změny v plicích jelení zvěře při spontánní infekci hlístnic čeledi *Protostrongylidae*

SCREENINGOVÁ METODA PRO IMUNOCHEMICKÉ SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ AFLATOXINU A OCHRATOXINU A V OBILNINÁCH A KRMIVECH

L. Fukal, M. Marek

FUKAL, L. — MAREK, M. (Vysoká škola chemicko-technologická, Praha): *Screeningová metoda pro imunochemické simultánní stanovení aflatoxinu a ochratoxinu A v obilninách a krmivech*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (2): AK

Byla navržena a ověřena imunochemická metoda pro simultánní stanovení aflatoxinu a ochratoxinu A za použití směsných roztoků následujících reagensů: standardů obou mykotoxinů, antisér proti jednotlivým mykotoxinům a radioligandů ^{125}I -aflatoxinu B₁ a ^{125}I -ochratoxinu A. Výsledkem analytické procedury je hodnota koncentrace sumy aflatoxinu a ochratoxinu A ve vzorku. Spotřeba reagensů a pracovní náročnost simultánní analýzy je poloviční ve srovnání s imunostanovením obou mykotoxinů jednotlivě. Navržená simultánní imunoanalýza je vhodná k velkoplošné kontrole nezávadnosti obilnin a krmiv z hlediska obsahu aflatoxinu a ochratoxinu A.

krmiva; aflatoxin; ochratoxin A; simultánní radioimunoanalýza

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity některých plísní. Svými toxickými účinky mohou nepříznivě ovlivňovat užitkovost hospodářských zvířat i zdraví člověka. Proto jsou pro nejtoxičtější mykotoxiny legislativně ustanovovány nejvyšší přípustné koncentrace v krmivech i v potravinách (Van Egmond, 1989). Mezi nejvíce sledované patří aflatoxiny a ochratoxin A. Pro stanovení jednotlivých mykotoxinů se používají specifické, především chromatografické metody. Vedle nich byly v poslední době rozpracovány ke stanovení řady mykotoxinů také imunochemické metody (Fukal aj., 1988; Pestka, 1988; Morgan, 1989). Ty se s výhodou mohou uplatnit především při analýze velkých sérií vzorků. Význam aplikace imunochemických metod při kontrole výskytu mykotoxinů jistě vzroste po jejich nedávném začlenění mezi oficiální analytické metody AOAC (Scott, 1989).

Za účelem vyšetřování vzorků krmiv a potravin na přítomnost více mykotoxinů jsou vypracovávány multidetekční metody pro extrakci a chromatografickou separaci celých skupin mykotoxinů (Gimeno, 1979; Ehrlich a Lee, 1984; Letutour aj., 1983; Grabarkiewicz-Szczesna aj., 1985). V této práci je demonstrována možnost současného stanovení aflatoxinů a ochratoxinu A imunochemickou metodou za použití komerčně vyráběných souprav.

MATERIÁL A METODY

Soupravy RIA-test-AFLA B₁ a RIA-test-OCHRA pro radioimunochemické stanovení aflatoxinu B₁ a ochratoxinu A byly dodány z Ústavu radioekologie a využití jaderné techniky v Košicích.

Extrakce vzorku: Z rozemletého homogenního vzorku krmiva či obilnin (50 g) byly naváženy 2 g, zvlhčeny 1 ml 0,1 M H₃PO₄ a extrahovány 20 ml chloroformu třepáním po dobu 30 minut. Po filtraci chloroformové vrstvy byl extrakt odpařen a odparek rozpuštěn ve 4 ml acetonu. 0,1 ml takto připraveného acetonového extraktu bylo přidáno k 0,9 ml veronalového pufru. V tomto roztoku byl metodou RIA stanoven aflatoxin a ochratoxin A.

Radioimunochemické stanovení mykotoxinů v extraktech bylo provedeno podle návodů pro použití analytických souprav za sjednocení procedury pro aflatoxiny a pro ochratoxin A. Ve zkumavkách se inkubovalo 100 μ l extraktu či standardu mykotoxinu, 100 μ l radioindikátoru a 100 μ l antiséra 60 minut při teplotě 45 °C a následně 20 minut při teplotě 4 °C. Po přidání 500 μ l vychlazeného roztoku polyetylglykolu byla vzniklá sraženina odstředěna a supernatant nad ní odsán. Ve sraženině na dně zkumavky byla měřena radioaktivita. Za účelem současného stanovení aflatoxinu a ochratoxinu A v jedné analýze byly smíchány roztoky odpovídajících standardů, antisér a radioligandů z obou souprav v poměru 1:1 a se získanými směsnými roztoky byla provedena stejná procedura RIA, jak je popsáno výše.

Křížové reakce antiséra na stanovení aflatoxinu měly hodnoty 100 % pro aflatoxin B₁, 53 % pro aflatoxin B₂, 63 % pro aflatoxin G₁, 10 % pro aflatoxin G₂ a 0 % pro ochratoxin A. Antisérum ze soupravy na stanovení ochratoxinu A je charakterizováno křížovými reakcemi s ochratoxinem A 100 %, s ochratoxinem B 4 %, s ochratoxinem C 27 % a s aflatoxinem B₁ 0 %.

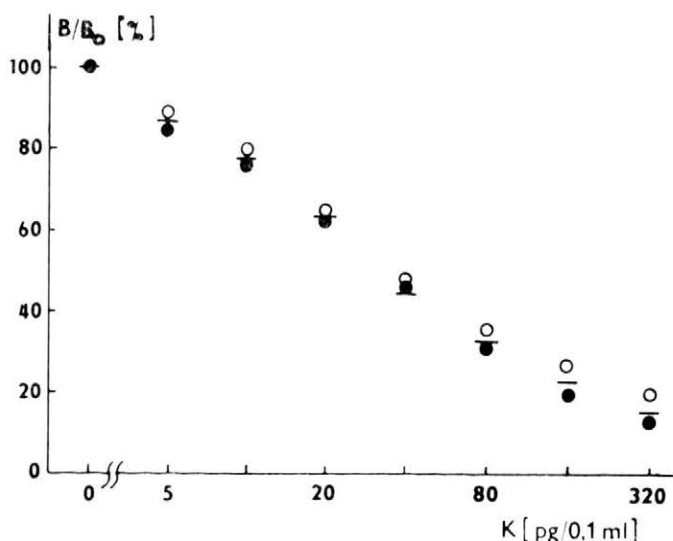
VÝSLEDKY A DISKUSE

Jelikož se zvyšujícími se požadavky na nezávadnost krmiv a potravin je mimo jiné nutné kontrolovat výskyt více mykotoxinů v tomto druhu vzorků, navrhli jsme simultánní stanovení aflatoxinů a ochratoxinu A v jedné analýze za využití imunochemických souprav pro oddělené stanovení těchto mykotoxinů.

Vzhledem k tomu, že v kalibračních grafech pro radioimunochemické stanovení aflatoxinu B₁ a stanovení ochratoxinu A (obr. 1) jsou hodnoty B/B₀ pro shodné koncentrace analytů velice podobné, byly reagenční roztoky pro simultánní stanovení úhrnné koncentrace aflatoxinu B₁ a ochratoxinu A připraveny smícháním reagenčních roztoků ze souprav pro stanovení jednotlivých mykotoxinů v poměru 1:1. Kalibrační graf pro simultánní radioimunoanalýzu je pak obdobný jako pro oddělené radioimunoanalýzy (obr. 1). Za uvedených okolností je nutnou podmínkou pro tuto shodu také přibližná rovnost hodnot radioaktivit vnášených do reakce při oddělených radioimunoanalýzách.

Použitelnost navržené simultánní analýzy ke kontrole výskytu zmíněných mykotoxinů v obilninách a krmivech byla ověřována porovnáním výsledků s výsledky jednotlivých radioimunoanalýz (tab. I). U řady vzorků se hodnoty součtu koncentrace aflatoxinu a ochratoxinu A získané uvedenými dvěma způsoby liší o 10 % a více, ale u žádného z osmi analyzovaných vzorků nepřesahuje odchylka 20 %. Podstatné je, že při navržené simultánní radioimunoanalýze aflatoxinu a ochratoxinu A je spotřeba reagensií i pracovní náročnost poloviční ve srovnání se stanovením obou mykotoxinů jednotlivě. Simultánní metoda ovšem neumožňuje v případě pozitivního nálezu rozhodnout, kterým ze dvou mykotoxinů je vzorek kontaminován, či v jakém poměru se oba ve vzorku na-

cházejí. Informuje pouze s postačující přesností o koncentraci sumy aflatoxinu a ochratoxinu A. Proto může nalézt uplatnění při velkoplošných kontrolách nezávadnosti obilnin a krmiv.



1. Kalibrační závislosti pro různé systémy radioimunoanalýzy; B — specifická vazba radioligandu při různých koncentracích standardu mykotoxinu, B_0 — specifická vazba radioligandu v nepřítomnosti mykotoxinu, K — koncentrace standardu mykotoxinu (logaritmické souřadnice), ○ aflatoxin B_1 , ● ochratoxin A, — aflatoxin B_1 a ochratoxin A (1:1) — Calibration dependences for different systems of radioimmunoanalysis; B — specific bond of radioligand at different concentrations of mycotoxin standard, B_0 — specific bond of radioligand in the absence of mycotoxin, K — concentration of mycotoxin standard (logarithmic co-ordinates), ○ aflatoxin B_1 , ● ochratoxin A, — aflatoxin B_1 and ochratoxin A (1:1)

I. Porovnání výsledků stanovení koncentrace aflatoxinů a ochratoxinu A v obilninách a v krmivech pro prasata různými systémy radioimunoanalýzy — Comparison of the results of determination of aflatoxin and ochratoxin A in cereals and feeds for pigs, using different radioimmunoanalytical systems

Analyzovaný vzorek ¹	Stanovené koncentrace mykotoxinů [$\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$] metodou ²		
	RIA-AFLA	RIA-OCHRA	RIA-(AFLA+OCHRA)
Krmivo ³ I	17	ND	15
Krmivo ³ II	48	66	97
Krmivo ³ III	ND	28	31
Krmivo ³ IV	62	ND	54
Pšenice ⁴ I	ND	ND	ND
Pšenice ⁴ II	6	ND	6
Ječmen ⁵ I	4	6	8
Ječmen ⁵ II	ND	85	73

ND = obsah mykotoxinu nižší než detekční limit metody — ND = not detected: mycotoxin level below the method's detection threshold

¹analyzed sample, ²determined mycotoxin concentrations method, ³feed, ⁴wheat, ⁵barley

Pokud bychom chtěli hodnotit kontaminaci obilnin z hlediska nejvyšších přípustných koncentrací (Anonym, 1986), které jsou pro aflatoxin B₁ 5 µg.kg⁻¹ a pro ochratoxin A 20 µg.kg⁻¹, simultánní stanovení obou mykotoxinů by si vyžádalo určitou úpravu. Ředění antisér by muselo být změněno tak, aby měly shodný průběh kalibrační křivky pro oddělenou radioimunoanalýzu aflatoxinu B₁ a čtyřnásobných množství ochratoxinu A.

Literatura

- ANONYM: Nejvyšší přípustné množství cizorodých látek znečišťujících v potravinách. Část druhá — Mykotoxiny. Hygienické předpisy svazek 61/1986, č. 69, Ministerstvo zdravotnictví ČR, Příloha č. 2, Praha, Avicenum, 1986, s. 21.
- EHRLICH, K. C. — LEE, L. S.: Mycotoxins in grain dust: method for analysis of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, vomitoxin, and secalonilic acid D. J. Assoc. off. analyt. Chem., 67, 1984, s. 963—967.
- FUKAL, L. — RAUCH, P. — KÁŠ, J.: Využití imunochemických metod v potravinářské analytické chemii. I. Stanovení neimunogenních nízkomolekulárních látek. Chem. Listy, 82, 1988, s. 959—977.
- GIMENO, A.: Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin, and penitrem A. J. Assoc. off. analyt. Chem., 62, 1979, s. 579—585.
- GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J. — GOLINSKI, P. — CHELKOWSKI, J. — SZEBIOTKO, K.: Mycotoxins in cereal grain. Part XI. Simple multidetection procedure for determination of 11 mycotoxins in cereals. Nahrung, 29, 1985, s. 229—240.
- LETUTOUR, B. — TANTAOU-ELARAKI, A. — IHLAL, L.: Simultaneous detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in olive oil. J. Amer. Oil Chem. Soc., 60, 1983, s. 835—837.
- MORGAN, M. R. A.: Mycotoxin immunoassays. Tetrahedron, 45, 1989, s. 2237—2250.
- PESTKA, J. J.: Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. J. Assoc. off. analyt. Chem., 71, 1988, s. 1075—1081.
- SCOTT, P. M.: Mycotoxins. J. Assoc. off. analyt. Chem., 72, 1989, s. 75—80.
- VAN EGMOND, H. P.: Current situation in regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. Food Addit. Contam., 6, 1989, s. 139—188.

Došlo dne 26. 1. 1990

FUKAL, L. — MAREK, M. (College of Chemical Technology, Praha): *Screening method for immunochemical simultaneous determination of aflatoxin and ochratoxin A in cereals and feeds*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (2): AK

An immunochemical method was proposed for simultaneous determination of aflatoxin and ochratoxin A with the use of mixed solutions of the following reagents: standards of both mycotoxins, antisera against the mycotoxins, and radioligands of ¹²⁵I-aflatoxin B₁ and ¹²⁵I-ochratoxin A. The result of the analytical procedure is the value of concentration of the aflatoxin + ochratoxin A sum in the sample. The procedure needs half the amount of reagents as separate determination of each of the two mycotoxins, and is far less laborious. The proposed simultaneous immunoanalysis is suitable for large-area inspection of grain and feed safety from the viewpoint of aflatoxin and ochratoxin A levels.

feeds; aflatoxin; ochratoxin A; simultaneous radioimmunoanalysis

Adresa autorů:

Ing. Ladislav Fukal, CSc., doc. ing. Miroslav Marek, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3—5, 166 28 Praha 6

VYUŽITÍ GLYCERÍNU PŘI DETEKCI OOCYST *Cryptosporidium parvum* A *C. baileyi* V TRUSU SAVCŮ A PTÁKŮ

Diagnostika protozoárního onemocnění vyvolaného kokciidemi rodu *Cryptosporidium* (*Apicomplexa: Cryptosporidiidae*) byla až do druhé poloviny 70. let založena především na průkazu vývojových stadií prvoka v daném hostiteli metodami rutinního histologického vyšetřování a v roztěrech slizničního epitelu ilea (případně i jiných úseků střev) nebo pomocí elektronové mikroskopie. V té době byly nálezy více méně nahlédly a většinou pouze doplňovaly výsledky speciálních mikrobiologických a virologických vyšetření při hledání původců průjemových onemocnění, nutných porážek a úhyňů různých hostitelů. Situace se výrazně změnila zjištěními, kdy zejména Panciera aj. (1971) u jedné jalovičky, Barker a Carbonell (1974) u tele a jehňat, Nime aj. (1976) u člověka a v následujícím období (1978–1982) řada dalších autorů upozornila na patogenní působení kryptosporidií a jejich významný podíl na vysoké morbiditě a mortalitě zejména mláďat hospodářských zvířat. Tato skutečnost proto znamenala potřebu metodik diagnostikovat prvoka u živých hostitelů a přispěla k tomu, že se začaly poměrně velmi rychle vyvíjet nejrůznější jednoduché či složitější metody detekce kokciid rodu *Cryptosporidium*.

Detailní a opravdu skvělý popis endogenního vývoje *C. parvum* u myši (Tyzzar, 1912) a potvrzení jeho zjištění o existenci oocyst se čtyřmi sporozoity vylučovanými trusem nakažených hostitelů do vnějšího prostředí (Iseki, 1979) při popisu *C. felis* z koček se staly důležitým mezníkem jak pro rutinní diagnostiku kryptosporidiových nákaz, tak i k různým experimentálním studiím *Cryptosporidium* spp.

Průkaz oocyst kryptosporidií v trusu je tedy základem diagnostiky prvoka stejně jako oocysty, např. kokciid rodu *Eimeria*, cysty prvoků a vajíčka nebo larvy helmintů.

Složitost a problematika detekce oocyst kryptosporidií spočívá především v jejich malé velikosti ($4,5-6,3 \times 4,5-5,5 \mu\text{m}$), v tom, že oocysty jsou bezbarvé a mohou být nezkušeným pozorovatelem zaměněny za cysty některých kvasinek, hub a nejčastěji jsou prostě přehlíženy. Proto se používají k diferenciální diagnostice různé barvicí metody roztěrů trusu (např. metoda podle Henriksena a Pohlenze, 1981). I když je pro tohoto prvoka charakteristické, že v době patentní periody dochází k ohromnému počtu vylučování oocyst trusem nakažených hostitelů, přesto mají tyto metody (pokud se nevyšetří série více roztěrových preparátů z téhož hostitele) určitou nevýhodu v tom, že se nemusí podařit „zachytit“ ty případy, kdy intenzita vylučovaných oocyst je z různých důvodů nízká. Z těchto důvodů se proto používají flotační-centrifugační metody s využitím různých nasycených roztoků, které zkoncentrují parazitární zárodky do vrchní vrstvy supernatantu, která se potom vyšetřuje.

Cílem tohoto krátkého sdělení je uvést metodiku detekce oocyst kryptosporidií v trusu savců a ptáků (v nativním preparátu) s využitím glycerínu, který se také vyznačuje koncentračními vlastnostmi podobně jako jiné flotační roztoky.

POPIS METODIKY

1–3 gramy vzorku trusu rozmícháme dobře ve třetí misce nebo ve zkumavce s takovým množstvím vody či fyziologického roztoku, abychom získali řidkou až vodnatou směs, kterou můžeme podle potřeby ještě přecedit přes čajové sítko k odstranění hrubých nečistot. Tekutinu promícháme a pomocí Pasteurovy pipety nebo ponořením ézy do hloubky filtrátu nanese na podložní sklíčko tři kapky takto připraveného vzorku nebo vodnatých výkalů při průjemových onemocněních telat a jehňat. Ke každé přidáme po kapce koncentrovaného glycerínu nebo ředěného 1:1 destilovanou vodou a skleněnou tyčinkou promícháme. Také při detekci oocyst *C. baileyi* při „bursální, kloakální a respirační“ nákaze (Pavlásek, 1987a, b) přidáváme glycerín ke kapkám tekutiny získané z výplachů kloaky a dutiny zobáku. Při přiložení krycího sklíčka prohlížíme takto připravený nativní preparát při zvětšení mikroskopu 400–600krát.

Oocysty kryptosporidií flotují okamžitě nahoru a koncentrují se v nejvrchnější vrstvě nejbližší k objektivu mikroskopu. Velmi významným jevem je, že působením glycerínu dochází v optickém mikroskopu k typicky růžovému zbarvení vnitřního obsahu oocyst a jejich stěny jsou kontrastní. Toto zbarvení je ještě výraznější, použijeme-li místo modrého filtru mléčně bílý. Těžší zbytky výkalů zůstávají v sedimentu a stejně jako bakterie a ostatní struktury se po působení glycerínu nemění a především zůstávají bezbarvé. Ve výplaších kloak k dutin zobáků, ale i v trusu spontánně nakažených kuřat a jiných ptáků, se v důsledku lokalizace *C. baileyi* odlupují narušené epitelální buňky sliznic kloaky, bursy Fabricii nebo jsou obsaženy v nadměrně vylučovaném hleně při „respiratorní“ kryptosporidiové nákaze. Tato metodika v takových případech umožňuje prokázat sexuální stadia, nezralé i zralé oocysty ještě uvnitř parazitoforní vakuoly s narůžovělým nádechem, které se liší od destruované bezbarvé tkáně hostitele.

Podle našich zkušeností doporučujeme, aby diagnostika oocyst *C. parvum* byla provedena do 30 minut po smíchání vyšetřovaného vzorku tekutiny trusu s glycerínem, neboť po jeho delším působení dochází k narušení stěn oocyst a jejich determinace je potom velmi obtížná. V této souvislosti jsme zjistili, že oocysty *C. baileyi* jsou vůči glycerínu mnohem odolnější a lze je bez problémů detekovat ještě po 10–14 hodinách.

Závěrem lze konstatovat, že námi navrhovaná metodika je velmi rychlá a efektivní. Spolehlivě (po získání zkušeností) a jednoduchým způsobem umožňuje diferenciální diagnostiku oocyst *C. baileyi* a *C. parvum* v nativním preparátu při zvětšení mikroskopu 400–600krát. Proto ji doporučujeme veterinárním i humánním parazitologickým diagnostickým laboratorům k detekci oocyst kokcií rodu *Cryptosporidium*.

Literatura

- BARKER, I. K. — CARBONELL, P. L.: *Cryptosporidium agni* sp. n. from lambs, and *Cryptosporidium bovis* sp. n. from a calf, with observations on the oocyst. Z. Parasitenkunde, 44, 1974, s. 289–298.
- HENRIKSEN, S. A. — POHLENZ, J. F. L.: Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta veter. scand. 22, 1981, s. 594–596.
- ISEKI, M.: *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. Jap. J. Parasit., 28, 1979, s. 285–307.
- NIME, F. A. — BUREK, J. D. — PAGE, D. L. — HOLSCHEER, M. A. — YARDLEY, J. H.: Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. Gastroenterology, 70, 1976, s. 592–598.
- PANCIERA, R. J. — THOMASSEN, R. W. — GARNER, F. M.: Cryptosporidial infection in a calf. Veter. Pathol., 8, 1971, s. 479–484.
- PAVLÁSEK, I.: Studies on the life cycle of *Cryptosporidium coccidia* in experimentally infected chickens. Folia parazit. (Praha), 34, 1987a, s. 193–197.
- PAVLÁSEK, I.: Rychlá metoda detekce oocyst kokcií rodu *Cryptosporidium* u kuřat. Veter. Med. (Praha), 32, 1987b, s. 509–510.
- TYZZER, E. E.: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenkunde, 26, 1912, s. 394–412.

Ing. Ivan Pavlásek, DrSc., Parazitologický ústav ČSAV, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

POKyny PRO AUTORY VĚDECKÉHO ČASOPISU VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje původní práce, recenze apod.

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být připojeno prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu i kvalitě prací. Jednotlivé práce nemají mít rozsah větší než 10 až 12 stran psaných na stroji se všemi přílohami.

Technická úprava rukopisu. Úprava rukopisu má odpovídat ČSN 88 0220 (formát A, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, tzn., že mezi řádky se dělají dvojité mezery). Ilustrace, grafy, tabulky a fotografie (černobílé) mají vyhovovat ČSN 88 2109, dodávají se zvlášť a nepodlepují se. Rýsují se tuší na bílý nebo pauzovací papír a popisují se jednotnou velikostí písma (šablona 3,5 mm). Na zadní straně se vyznačí tužkou pořadové číslo obrázku a napíše se jméno autora článku. Texty k obrázkům se dodávají na zvláštním listě, umístění obrázků se označuje na levém okraji příslušné strany rukopisu číslicí v kroužku. Tabulky se číslují římskými číslicemi. Na všechny obrázky i tabulky musí být v textu práce odkazy. Pro překlad do angličtiny je nutné vysvětlit všechny použité zkratky.

Úprava vlastní práce. Název práce nemá přesahovat 85 úhozů. Je nutné se v názvu vyvarovat obecných frází jako: Studie o..., Příspěvek k... Každý zaslaný článek musí být samostatnou prací, nemohou být publikovány články na pokračování, stejně tak jsou vyloučeny podtituly článků.

Jména autorů se uvádějí bez titulů — příjmení a první písmeno jména.

Souhrn. Vypracování souhrnu je nutné věnovat obzvláštní péči. Autor do něho má shrnout vše, co je na jeho práci pozoruhodné a nové a co má být dokumentováno. Souhrn má být nekritickým informačním výběrem významného obsahu a závěru, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, nemá ji však nahradit. Nesmí překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl psán celými větami, nikoliv telegrafickým způsobem. Pro překlad do angličtiny se požaduje souhrn delší (do dvou rukopisných stran) s odkazy na tabulky a obrázky, popř. s anglickými odbornými termíny nebo už přeložený do angličtiny. Souhrn začíná jménem autorů, názvem pracoviště a jeho sídlem (v závorce), titulem článku a citací: Veter. Med. [Praha], 00, 1990. Místa označená nulami doplní na kompletní citaci při korektuře redakce.

Klíčová slova. Pod souhrn je nutno po vynechání řádky připojit klíčová slova. Ta mají sloužit k rychlé orientaci a při zařazování práce do kartotéky. Klíčových slov by nemělo být méně než 3 a více než 12. Začínají malým písmenem a oddělují se středníkem.

Úvod. Úvod má obsahovat hlavní důvody proč byla práce uskutečněna a velmi stručnou formou stav studované otázky. Je nutné se v něm vyhnout rozsáhlým historickým přehledům. Uvádí se bez nadpisu, je možné v něm uvést k práci se vztahující citaci autorů (doporučuje se co nejnížší počet citací — čtyři až osm autorů).

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

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

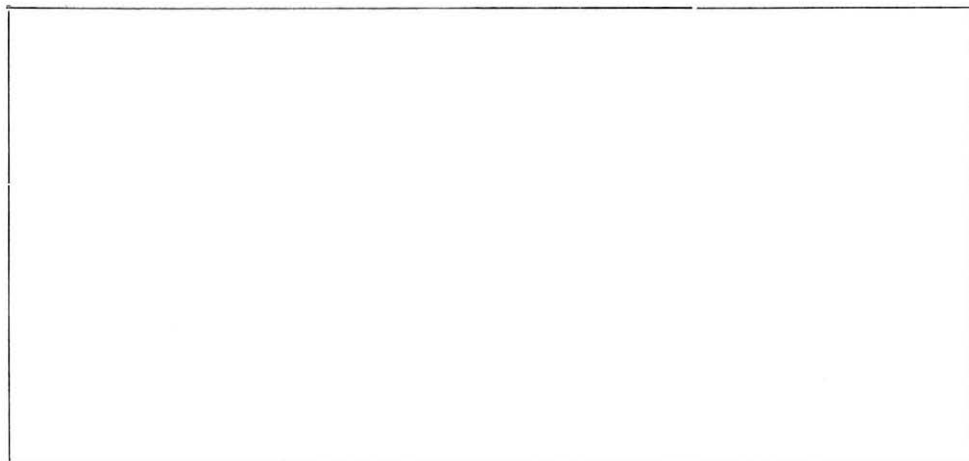
Diskuse. Diskuse obsahuje zhodnocení práce. Diskutuje se o možných nedostacích a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, kteří mají k publikované práci bližší vztah), pokud mají souvislost nebo pokud jsou s předloženou prací nějak srovnatelné.

Literatura. V textu se při citaci uvede jméno autora a rok publikování. Do seznamu se zařadí všechny práce citované v textu článku, a to podle abecedy, bez číslování, každá citace na novém řádku. Je-li více prací od téhož autora ve stejném roce, přidá se k letopočtu označení a, b, c. Literatura musí odpovídat ČSN 01 0197.

Zkratky názvů časopisů je třeba dodržovat podle publikace doc. Bojňanského a kol., vydané v roce 1982 Slovenskou akadémiou vied pod názvom Periodiká z oblasti biogigeko-poľnohospodárskych vied, ich citácie a skratky.

Adresa autora. Na zvláštním listě uvede autor akademický titul, jméno (ne jen zkratku), příjmení, vědeckou hodnost a podrobnou adresu pracoviště s PSČ. Tož





Rukopisy odevzdány k tisku 15. 4. 1991 — Podepsáno k tisku 23. 10. 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 TISKÁRNY, 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, 180 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.