

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

4

ČÍSLO 38 (LXVI)
PRAHA 1993
ISSN 0375-8427

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
SLOVENSKÁ AKADEMIA PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

The journal publishes experimental papers and reviews from all spheres of veterinary medicine

The contents of all editions and paper summaries are covered by Current Contents - Agriculture, Biology and Environmental Sciences

Editorial Board - Redakční rada

Prof. MVDr. Jan B o u d a , DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumír H o f í r e k , DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Karel H r u š k a , CSc., (Chairman), Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Gabriel K o v á č , DrSc., University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Doc. MVDr. Imrich M a r a č e k , DrSc., Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Doc. MVDr. Zdeněk P o s p í š i l , CSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Ivan R o s i v a l , CSc., Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Prof. MVDr. Bohumil Š e v č í k , DrSc., Research Institute of Feed Supplements and Veterinary Drugs, Jílové u Prahy, Czech Republic

Editor in Chief - Vedoucí redaktorka

Ing. Zdenka Radošová

DETEKCIA BOVINNÉHO HERPESVÍRUSU-1 METÓDOU DOT-BLOT HYBRIDIZÁCIE

Š. Vilček¹, I. Deliová², O. Forgáč², L. Strojný², M. Harvan¹, G. Benko³

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

²Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice

³Štátny veterinárny ústav, Košice

Na detekciu BHV-1 (etiologický agens IBR) bola použitá metóda dot-blot hybridizácie na nitrocelulózových filtroch a rôzne typy DNA sond (dvojvláknové rekombinantné plazmidy, jednovláknové rekombinantné fágy rady M 13 a 40 bp synteticky oligonukleotid). Genómová DNA BHV-1 bola zo vzoriek (virióny, infikované bunky, nosové výtery a sekréty) izolovaná extrakciou s fenolom. Najvyššia citlivosť detekcie bola dosiahnutá s ³²P-p UR-1 sondou (1,8 kb náhodný EcoRI - Hind III fragment vli-govaný do plazmidu pUC 9), ktorá detekovala genóm BHV-1 v 5.10³ infikovaných MDBK bunkách. Táto sonda nereagovala s herpetickými vírusami BHV-2, BHV-3, BHV-4 a vírusom Aujeszkeho choroby. Kvalita sondy pUR-1 bola ďalej overovaná na diagnostiku IBR u zvierat experimentálne infikovaných vírusom BHV-1 (intrana-zálna infekcia). BHV-1 bolo možné zistiť v nosových výteroch a sekrétoch u experi-mentálne infikovaných teliat už v 1. deň po infekcii, pričom množstvo agensa vrcholilo na 2. až 3. deň a na 6. - 7. deň výskyt vírusu značne poklesol. S digoxigenin-pUR-1, t. j. nerádioaktívne označenou sondou, bola prítomnosť vírusu výraznejšie potvrdená iba na 2. - 3. deň, v čase najvyššieho výskytu infekčného agensa. Na detekciu vírusu dot-blot hybridizáciou sa lepšie osvedčili nosové sekréty, ako nosové výtery. Technika izolácie vírusu na bukových kultúrach tiež potvrdila výskyt agensa už na 1. deň po infekcii, s maximom na 2. - 5. deň, ale oveľa spoľahlivejšie detekovala vírus aj na 6. až 7. deň po infekcii. Klinické príznaky IBR boli pozorované do 3. dňa a vrcholili na 6. deň po infekcii.

bovinný herpesvirus-1; BHV-1; DNA sondy; dot-blot hybridizácia; nitrocelulózové membrány; IBR

Bovinný herpesvirus-1 bol objavený v 50. rokoch v USA a je etiologickým agensom infekčnej bovinnej rinotracheitídy (M c K e r c h e r a i., 1975) a infekčnej pustulárnej vulvovaginitídy (K e n d r i c k a i., 1958), ale u hovädzieho dobytku (HD) tiež spôsobuje konjunktivitídu, enteritis, encefalitídu, aborty (G i b b s a R w e y e m a m u., 1977). BHV-1 je prenášaný aj spermiami býkov (K e n d r i c k a E n t e e., 1967). Multifaktoriálne infekčné účinky BHV-1 spôsobujú v chovoch HD značné ekonomické straty.

Tradičná laboratórna diagnostika BHV-12 je založená na izolácii vírusu na bunkových kultúrach. Z ďalších diagnostických metód sa využíva sérologický dôkaz špecifických protilátok, ELISA technika, imunofluorescenčný dôkaz špecifických

antigénov (Van Donkersgoed a Babiuk, 1991). Napriek úsiliu inovovať laboratórnu diagnostiku IBR, problémy s rýchlym, jednoduchým a špecifickým dôkazom vírusu BHV-1 pretrvávajú. Zvlášť problematická je diagnostika latentných stavov tejto vírusovej infekcie.

Pokroky v technikách rekombinantnej DNA dovolili začiatkom 80. rokov pristúpiť k inovácii diagnostiky mikroorganizmov využitím metód hybridizácie nukleových kyselín. Hybridizačnými technikami sa detekuje prítomnosť genómu mikroorganizmu vo vyšetrovaných vzorkách pomocou špecifických radioaktívne alebo neradioaktívne označených DNA/RNA sond (Viscidi a Yolken, 1987). Tento trend zasiahol aj diagnostiku infekčných chorôb vo veterinárnej medicíne (Paul, 1990).

Viacere laboratória už overovali detekciu genómu BHV-1 rôznymi technikami hybridizácie nukleových kyselín (Dorman a i., 1985; Dunn a i., 1986; Andino a i., 1987; Rock a i., 1986; Pacciarini a i., 1988; Belák a i., 1988). Výsledky ich experimentov naznačujú perspektívu využitia molekulárno-genetických metodík aj pri inovácii diagnostiky IBR.

V našej práci sme využili na detekciu BHV-1 rôzne typy DNA sond (na báze dvojvláknovej alebo jednovláknovej DNA, syntetický DNA fragment) s cieľom vybrať najvýhodnejšiu z nich na diagnostiku IBR u hovädzieho dobytká.

MATERIÁL A METÓDY

VÍRUSY A BUNKOVÉ KULTÚRY

Suspenzia MDBK buniek bola infikovaná BHV-1 (kmeň R-6 zo zbierky mikroorganizmov VÚVeL Brno) s M.O.I. = 1 PFU/b. po dobu 24 hodín. Bunky boli po infikovaní vírusom resuspendované a rozdelené paralelne s neinfikovanými bunkami ako kontrolou do skúmaviek o počtoch 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , $5 \cdot 10^6$ a 10^7 . Po doplnení objemu na 0,5 ml s fyziologickým roztokom bola z buniek izolovaná DNA fenolovou technikou.

Pri overovaní špecifity sondy pUR-1 bola použitá DNA vyizolovaná z rôznych herpetických vírusov: BHV-1 (kmeň HB 176), BHV-2 (kmeň TV), malignant catarrhal fever virus - BHV-3 (kmeň WC 11), BHV-4 (kmeň Movar 33/63), vírus Aujeszkeho choroby (kmeň Benatky 86), všetky zo zbierky mikroorganizmov VÚVeL v Brne.

EXPERIMENTÁLNA INFEKCIA TELIAT

Do pokusu bolo vybraných päť 6-7 mesačných klinicky zdravých teliat, u ktorých neboli zistené sérové protilátky proti IBR. Zvieratá boli intranazálne infikované suspenziou BHV-1 o titri $10^{8,5}$. Na dôkaz BHV-1 boli zvieratá na 0. - 7. deň po infekcii, každý deň odoberané nosové výtery a sekréty. Zároveň bola zvieratám meraná telesná teplota a pozorované klinické príznaky infekcie IBR.

ODBER NOSOVÝCH VÝTEROV

Nosové výtery boli odoberané pomocou vatového tampóna, starostlivým krúživým pohybom. Vata s nosovým výterom sa ponorila do 1,5 ml fyziologického rozto-

ku s ochrannými antibiotikami a nechala cez noc pri teplote 4 °C. Potom sa z vaty vytlačil roztok, odobralo sa 0,3 ml roztoku, fyziologickým roztokom doplnilo na objem 0,5 ml a fenolovou technikou sa izolovala DNA. Druhá časť vzoriek bola použitá na dôkaz BHV-1 izoláciou vírusu.

ODBER NOSOVÝCH SEKRETOV

Paralelne s odberom nosových výterov sa u experimentálne infikovaných zvierat odobrali aj nosové sekrety technikou podľa autorov Ž u f f a a i. (1982). Tampóny sa zasunuli na 10 - 15 minút hlboko do nosového otvoru zvieraťa. Z 1 - 3 ml získaného sekretu sa odobralo 0,2 ml roztoku, doplnilo sa na objem 0,5 ml s fyziologickým roztokom a fenolovou technikou sa izolovala DNA.

IZOLÁCIA A DENATURÁCIA DNA

K 500 µl vzorky sa pridalo 50 µl 10% SDS a 5 µl proteinázy K (20 mg/ml) a inkubovalo 1 - 1,5 h pri teplote 37 °C. Potom sa vodný roztok dvakrát extrahoval rovnakým objemom fenolu a reextrahoval fenol-chloroformom (1 : 1). DNA sa z vodnej fázy vyzrážala 2 obj. etanolu v prítomnosti 0,25 M CH₃COONa, pH 5,2. DNA bola rozpustená v 50 - 100 µl TE pufru a na hybridizáciu sa použilo 5 µl roztoku. Pred nanášaním na NC filter sa DNA denaturovala zahriatím vo vriacej vode (5 min) a ponorením do ľadu. Niektoré vzorky boli denaturované pôsobením 0,5 M NaOH (M a n i a t i s a i., 1982).

DNA SONDY

Na hybridizáciu boli použité tieto sondy:

- Rekombinantný plazmid pUR-1 zostrojený z plazmidu pUC-9 vligovaním 1,8 kb EcoRI - Hind III náhodného fragmentu DNA BHV-1 (láskavo poskytnutý Laboratóriom génového inžinierstva Moskovskej veterinárnej akadémie.)
- Rekombinantný plazmid pUR-2 zostrojený z plazmidu pAT 153 vligovaním 4,8 kb SalI - PstI fragmentu DNA BHV-1, ktorý obsahoval 2/3 vírusového immediately early (IE) génu.
- Jednovláknová forma (ss) fágu M13mp18 s vligovaným 443 bp (sonda pMR-1) alebo 273 bp (sonda pMR-2) inzertom obsahujúcim sekvenciu z 3'-kódujúcej oblasti IE génu.
- 40 bp syntetický DNA oligomér navrhnutý z génu BHV-1, ktorý kóduje imunologicky dôležitý gI vírusový glykoproteínový antigén (W h i t b e c k a i., 1988).

Dvojvláknové DNA (ds DNA) boli značené s využitím [³²P - α dCTP] (Izinta, Maďarsko) metódou nick translácie (kit fy Amersham); jednovláknové DNA multiprime labelling systémom (kit fy Amersham); syntetický oligomér s využitím [³²P - γ ATP] (Izinta, Maďarsko) 5'-koncovým značením (M a n i a t i s a i., 1982). Rekombinantný plazmid pUR-1 bol značený aj digoxigeninom (kit fy Boehringer Mannheim). Pred hybridizáciou boli ds DNA sondy denaturované alkalickou metódou (M a n i a t i s a i., 1982).

Na nitrocelulózové (NC) membrány (Hybond N, fy Amersham) sa nanieslo po 5 µl analyzovanej vzorky denaturovanej DNA a po vysušení sa filter zohrial vo vákuovej sušiarňi na teplotu 80 °C po dobu 2 hodín. Na predhybridizáciu (68 °C/2 až 3 h) sa použil predhybridizačný roztok o zložení 6 x SSC, 0,5% SDS, 5 x Denhartov roztok, 100 µg/ml denaturovanej sledovanej DNA. K hybridizácii (68 °C/18 h) sa použil roztok rovnakého zloženia, ale namiesto heterológnej DNA bola pridaná denaturovaná ³²P-DNA sonda (100 ng). Pri použití syntetického 40 bp DNA oligoméru bola predhybridizačná a hybridizačná teplota znížená na teplotu 58 °C. Po skončení hybridizácie boli NC membrány premyté 15 min/20 °C v roztoku 1 x SSC + 0,5 % SDS, 15 min/20 °C v roztoku 1 x SSC + 0,1 % SDS a 3 x 20 min/68 °C alebo 58 °C pre 40 bp DNA sondu v roztoku 0,1 x SSC + 0,5 % SDS. Po vysušení membrán boli rádioaktívne škvrny detekované autorádiografiou 1 - 3 dni na RTG filme.

Hybridizácia a detekcia s digoxigenínom značenou pUR-1 sondou bola robená podľa pokynov výrobcu kitu (Boehringer Mannheim).

IZOLÁCIA VÍRUSU Z NOSOVÝCH VÝTEROV

Izolácia vírusu bola robená na MDBK bunkách pozorovaním cytopatického efektu.

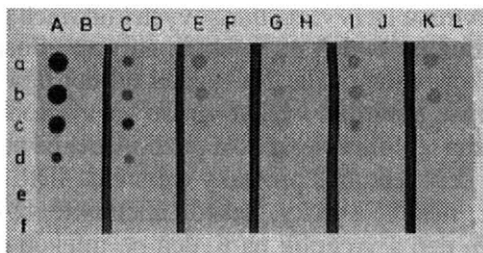
VÝSLEDKY

Metódou dot-blot hybridizácie na nitrocelulózových filtroch bola dokázaná prítomnosť DNA BHV-1 v infikovaných bunkových líniiach všetkými typmi použitých ³²P-DNA sond. S neinfikovanými kontrolnými MDBK bunkami neboli zistené pozitívne signály. Avšak so vzorkou obsahujúcou 10⁷ buniek sa u niektorých DNA sond objavila slabá nešpecifická škvrna. Najvýraznejšie sa táto nešpecifická reakcia objavila pri hybridizácii so syntetickým oligomerom (obr. 1, L). Najväčšia citlivosť bola dosiahnutá s rekombinantným plazmidom pUR-1. Táto sonda spoľahlivo detekovala vírus vo vzorke pripravenej z 10⁵ BHV-1 infikovaných MDBK buniek (obr. 1, A). Pretože pri nanášaní na NC filter bola použitá iba 1/20 vzorky, sonda detekovala genóm BHV-1 prakticky už u 5.10³ infikovaných buniek. Identické výsledky ako s ³²P-pUR-1 boli získané pri hybridizácii vzoriek s 1,8 kb inzertom DNA BHV-1 vyštiepeným z pUR-1 (obr. 1, C).

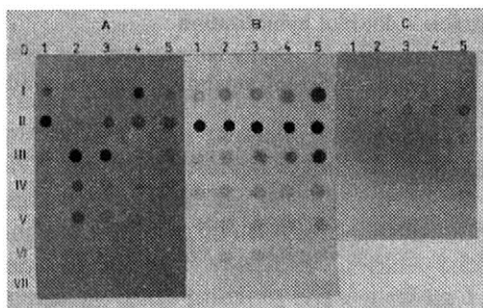
So sondou pUR-1 nebola pozorovaná skrížená hybridizačná reakcia s herpes vírusami BHV-2, 3, 4 a s vírusom Aujeszkeho choroby (výsledky nie sú uvedené).

Kvalita sondy ³²P-pUR-1 bola ďalej overovaná na dôkaz BHV v nosových výteroch a sekrétoch experimentálne infikovaných teliat. Dot-blot hybridizácia potvrdila prítomnosť BHV-1 v nosových výteroch teliat už na 1. deň po infekcii. Maximálny výskyt infekčného agensu kolísal od vzorky k vzorke (obr. 2, A), t. j. na 1. deň (teľa č. 4), na 2. deň (teľa č. 1,5) alebo na 3. deň (teľa č. 2,3). U všetkých vyšetrovaných zvierat infekcia ustúpila na 6. - 7. deň.

Presvedčivejšie výsledky boli dosiahnuté pri analýze nosových sekrétov. U vyšetrovaných teliat sonda ³²P-pUR-1 detekovala prítomnosť vírusu BHV-1 tiež už na 1. deň po experimentálnej infekcii, ale jednoznačne maximum infekcie bolo zachy-



1. Dôkaz BHV-1 dot-blot hybridizáciou u experimentálne infikovaných MDBK buniek s rôznymi ^{32}P -DNA sondami. Bunky: A, C, E, G, I, K - Infikované MDBK bunky, B, D, F, H, J, L - kontrolné neinfikované bunky; a - 10^7 , b - $5 \cdot 10^6$, c - 10^6 , d - 10^5 , e - 10^4 , f - 10^3 MDBK buniek. Sondy: A, B - pUR-1; C, D - 1,8 kb EcoRI-Hind III fragment DNA BHV-1 vyštiepený z pUR-1; E, F - pUR-2; G, H - pMR-1; I, J - pMR-3; K, L - 40 bp DNA oligomér - Evidence of BHV-1 dot-blot hybridization in experimentally infested MDBK cells by various ^{32}P -DNA probes. Cells: A, C, E, G, I, K - infested MDBK cells, B, D, F, H, J, L - control uninfected cells; a - 10^7 , b - $5 \cdot 10^6$, c - 10^6 , d - 10^5 , e - 10^4 , f - 10^3 of MDBK cells. Probes: A, B - pUR-1; C, D - 1.8 kb EcoRI-Hind III fragment DNA BHV-1 split from pUR-1; E, F - pUR-2; G, H - pMR-1; I, J - pMR-3; K, L - 40 bp DNA oligomer



2. Dôkaz BHV-1 dot-blot hybridizáciou s ^{32}P -pUR-1 (A, B) a s digoxigenin - pUR-1 (C) v nosových výteroch (A) a v nosových sekrétoch (B, C) experimentálne infikovaných teliat. 1 - 5 = číslo infikovaného teľaťa; 0 = analýza vzoriek pred infekciou; I - VII = 1. až 7. deň po infekcii - Evidence of BHV-1 by dot-blot hybridization with ^{32}P -pUR-1 (A, B) and with digoxigenin - pUR-1 (C) of experimentally infested calves. 1 - 5 = number of infested calf; 0 = analysis of samples prior to infection; I - VII = days 1 to 7 from infection

tené na 2. - 3. deň, pričom infekcia na 6. - 7. deň odznievala (obr. 2, B). Pri označení pUR-1 digoxigeninom bol vírus detekovaný iba na 2. - 3. deň (obr. 2, C), t. j. v čase maximálneho výskytu infekčného agensa.

Technika izolácie vírusu BHV-1 na bunkových kultúrach potvrdila výskyt agensa v nosových výteroch už na 1. deň po infekcii, najviac vírusu bolo izolované na 2. - 5. deň, neskôr infekcia ustupovala. Na rozdiel od dot-blot hybridizácie, vírusová izolácia jednoznačnejšie potvrdila výskyt vírusu vo výteroch ešte aj na 6. - 7. deň (tab. I). Zvýšená telesná teplota zvierat bola pozorovaná už na 1. deň s maximálnymi hodnotami na 2. - 4. deň. Klinické príznaky ochorenia IBR (celková malátnosť, zápal nosných slizníc, nosové výtoky, neskôr hlienovité až krvavé, červené nosy) boli pozorované na 3. deň a vrcholili na 6. deň po infekcii (tab. I).

I. Porovnanie diagnostiky IBR u experimentálne infikovaného hovädzieho dobytku (výsledky boli získané z piatich zvierat) - Comparison of IBR diagnostics in experimentally infested of cattle (results were obtained from five animals)

Metóda ¹	Deň po infekcii ²							
	0	1	2	3	4	5	6	7
VI	-	+	+	+	+	+	+	+
DBH	-	+	+	+	+	+	+	-
T	-	-	+	+	+	+	+	+
KP	-	-	-	+	+	+	+	+

VI = metóda izolácie vírusu na bunkových kultúrach - method of virus isolation on cellular cultures

DBH = dot-blot hybridizácie - dot-blot hybridization

T = telesná teplota; + = nad 39,5 °C - body temperature; + = over 39.5 °C

KP = klinické príznaky (apatia, respiračný syndróm) - clinical syndromes (apathy, respiratory syndrome)

¹method, ²day from infection

DISKUSIA

Hybridizácia nukleových kyselín má viaceré výhody, ktoré sú vhodné na detekciu mikroorganizmov. Predovšetkým nie je potrebná kultivácia buniek, lebo pri hybridizačných technikách sa fyzikálno-chemickou metódou dokazuje priamo prítomnosť genómu mikroorganizmu. Molekulárna hybridizácia umožňuje zachytiť infekciu v rannom štádiu jej rozvoja, kedy sa ešte nesyntetizuje dostatok antigénov a ani nedochádza k syntéze špecifických protilátok. Princíp párovania nukleotidových báz zabezpečuje vysokú citlivosť a špecifickosť testu, čo sú ideálne parametre na diagnostickú metódu (Viscidi a Yolken, 1987; Petterson a Hyypä, 1985). Hoci rýchlosť hybridizačných testov je niekedy problematická, predovšetkým metóda dot-blot hybridizácie a jej modifikácie sa stále zrýchľujú, zdokonaľujú a zjednodušujú (Bělák a i., 1988).

Jednou z najdôležitejších zložiek metódy hybridizácie nukleových kyselín je špecifická sonda. V prípade detekcie BHV-1 značná dĺžka jeho DNA genómu (138kb) umožňuje vybrať množstvo potencionálne špecifických sond. Ich diagnostickú uži-

točnosť je potrebné overiť hybridizačnými experimentami, ktoré predovšetkým zistia ich špecificitu a citlivosť. Prevažná časť autorov využila na detekciu BHV-1 DNA sondy vo forme rekombinantných bakteriálnych plazmidov, ktoré obsahovali náhodne vligovaný inzert BHV-1. Napr. D o r m a n a i. (1985) využil pri dot-blot hybridizácii plazmid pCB2, ktorý pripravil vligovaním 9,6 kb Hind III fragmentu I genómu BHV-1 do plazmidu pBR 325 a D u n n a i. (1986) na *in situ* hybridizáciu plazmid pCB 31 s vligovaným Hind III fragmentom C vírusu BHV-1. Aj B e l á k a i. (1988) využil na dôkaz BHV-1 dot-blot hybridizáciu a plazmid pBH5 s 5,4 kb náhodným PstI inzertom a pBH 132 s dvoma Pst inzertami 3,08 kb a 1,3 kb vligovanými do plazmidu pKH 47. Metódou dot-blot hybridizácie talianski autori (P a c c i o r i n i a i., 1988) detekovali vírus BHV-1 v semenách býkov, pričom ako sondu použili plazmid pHV 2, ktorý obsahoval 12,5 kb Hind III fragment vligovaný do plazmidu pUC 8. Aj ďalší autori (A n d i n o a i., 1987) využili na detekciu genómu BHV-1 tri rôzne rekombinantné plazmidy pHBB 3, pHBB 4 a pHBB 51 s 8,9; 15,5 a 17,8 kb BamHI vírusovými fragmentami v plazmide pAT 153.

V našej práci sme použili na dôkaz BHV-1 rôzne typy DNA sond: dva dvojvláknové rôzne dlhé inzerty vligované do bakteriálnych plazmidov, dva krátke úseky genómu BHV-1 nachádzajúce sa v jednovláknovej forme fágu M 13 a synteticky 40 bp DNA oligonukleotid navrhnutý z nukleotidových sekvencií génu kódujúceho imunologicky dôležitý gI proteín (W h i t b e c k a i., 1988). Synteticky oligomér mal nižšiu citlivosť. Najvyššiu citlivosť pri detekcii BHV-1 sme získali so sondou pUR-1, ktorá bola skonštruovaná z plazmidu pUC 9 vligovaním náhodného 1,8 kb Hind III - EcoRI fragmentu BHV-1. Pretože táto sonda nereagovala s inými herpetickými vírusmi, bola využitá v ďalších experimentoch. Napriek tomu väčšiu perspektívu vkladáme na DNA sondy s využitím fágu M 13. Výskyt fágu M 13 v klinických vzorkách (napr. nosových výteroch teliat) je menej pravdepodobný ako výskyt bakteriálnych plazmidov, čím sa zníži riziko falošne pozitívnych reakcií. K zvýšeniu citlivosti DNA sondy na princípe jednovláknovej formy fágu M 13 bude potrebné vybrať vhodnejší inzert BHV-1.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že dot-blot hybridizáciou je možné detekovať infekciu už vo veľmi rannom štádiu. S využitím ^{32}P -pUR-1 bolo možné dokazovať u experimentálne infikovaných teliat infekciu BHV-1 už na 1. deň po infekcii, podobne ako metódou izolácie vírusu na bukových kultúrach. Klinické príznaky sa u zvierat objavili už na 3. - 4. deň. Maximum infekcie sme pri vyšetrovaní s ^{32}P -pUR-1 pozorovali na 2. - 3. deň, vírusovou izoláciou na 2. - 5. deň. V zhode s predpokladom bola digoxigeninom označená pUR-1 sonda menej citlivá (dôkaz vírusu len v maxime infekcie). Pri oboch metódach pokles výskytu vírusu v nosových výteroch a sekrétoch bol pozorovaný na 6. - 7. deň. Potrebné je zdôrazniť, že metóda izolácie vírusu zachytí výskyt vírusu aj v neskoršom štádiu (v našom experimente na 5. - 7. deň), kedy dot-blot hybridizácia nedáva jednoznačné výsledky. Túto závislosť pozoroval aj B e l á k a i. (1988). Podobný priebeh experimentálnej infekcie IBR u teliat pri vyšetrovaní metódou izolácie vírusu zistili aj iní autori (Ž u f f a a i., 1986; G i l l i a m a i., 1993).

Kvalita detekcie genómu BHV-1 metódou dot-blot hybridizácie závisí od spôsobu odberu vzoriek. Lepšie hybridizačné signály sme získali so vzorkami z noso-

vých sekrétov, než so vzorkami nosových výterov. Je to zrejme spôsobené tým, že v nosových sekrétoch sa získa kvantitatívnejšie množstvo vírusu, hoci odber trvá dlhšie, t. j. 10 - 15 minút. Rýchlejší odber nosových výterov (asi 1 min), metodicky kolíše od pokusu k pokusu.

Prezentované výsledky našich experimentov ako aj výsledky iných autorov (K u b í ě k a i., 1991) naznačujú perspektívu využitia metódy dot-blot hybridizácie pri detekcii vírusu BHV-1 v našich podmienkach. Metóda dot-blot hybridizácie môže zohrať dôležitú úlohu pri realizácii vypracovaných programov ozdravovania chovov hovädzieho dobytku od IBR (P o s p í š i l a i., 1992). Avšak skôr ako bude možné dot-blot hybridizáciu širšie využiť v laboratórnej diagnostickej praxi, musia sa urobiť rozsiahlejšie štúdie zamerané na porovnanie s klasickými metódami diagnostiky IBR (dôkaz sérologických protilátok, metóda izolácie vírusu na bukových kultúrach) u zvierat s prirodzeným výskytom IBR. Také štúdie sme už začali a postupne ich vyhodnocujeme (V i l ě k a i., 1992). Dostupnosť špecifických DNA sond otvára tiež možnosti rýchleho dôkazu BHV-1 aj v spermiiach býkov (V i l ě k a i., 1992; K u b í ě k a i., 1991).

Vyššia citlivosť a metodická jednoduchosť metódy PCR (S a i k i a i., 1985) zrejme v mnohých prípadoch nahradí hybridizačné techniky. Žiaľ, v odbornej literatúre dlho nebol popísaný prípad úspešnej amplifikácie fragmentu BHV-1 metódou PCR. Nedávno sme však v našom laboratóriu vyvinuli modifikovanú PCR metódu, ktorá umožňuje *in vitro* amplifikáciu 468 bp fragmentu gI génu BHV-1 (V i l ě k a i., 1993). Tým sa otvárajú ďalšie možnosti inovácie detekcie herpesvíru BHV-1.

PodĎakovanie

Ďakujeme Doc. MVDr. Alojzovi Ž u f f o v i, (Bioveta Nitra) za izoláciu vírusu BHV-1 z izolovaných vzoriek a Doc. MVDr. Viere B a j o v e j, CSc. (Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice) za kritické posúdenie rukopisu.

Literatúra

- ANDINO, R. H. - TORRES, H. N. - POLACINO, P. S. - SCHUDEL, A. - PALMA, E. L.: Detection of bovine herpesvirus-1 nucleic acid sequences, using a dot-blot hybridization procedure. Amer. J. veter. Res., 48, 1987, s. 984-987.
- BELÁK, S. - LINNE, T. MAGYAR, G. - HARRACH, B. - BENKÖ, M. - KLINGEBORN, R. - KLINTEVALL, K. - BARTHA, A. + Bovine herpesvirus-1: Rapid diagnosis of infection by direct filter hybridization. Moder. cell. Probe, 2, 1988, s. 147-156.
- DORMAN, M. A. - BLAIR, C. D. - COLLINS, J. K. - BEATY, B. J.: Detection of bovine herpesvirus-1 DNA immobilized on nitrocellulose by hybridization with biotinylated DNA probes. J. clin. Microbiol., 22, 1985, s. 990-995.
- DUNN, D. C. - BLAIR, C. D. - WARD, D. C. - BEATY, B. J.: Detection of bovine herpesvirus - specific nucleic acid by *in situ* hybridization with biotinylated DNA probes. Amer. J. Veter. Res., 47, 1986, s. 740-746.
- GIBBS, E. P. - RWEIEMAMU, M. M.: Bovine herpesviruses I. Bovine herpesvirus-1. Veter. Bull., 47, 1977, s. 317-343.

- GILLIAM, S. E. - THACKRAY, A. M. - BROWN, G. A. - FIELD, H. J.: The pathogenesis of wild type and drug resistant mutant strains of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in the natural host. *Arch. Virol.*, 128, 1993, s. 43-54.
- KENDRICK, J. W. - Mc ENTÉE, K.: The effect of artificial insemination with semen contaminated with IBR - IPV virus. *Cornell Veter.*, 57, 1967, s. 3-11.
- KENDRICK, J. W. - GILLESPIE, J. H. - Mc ENTÉE, K.: Infectious pustular vulvovaginitis of cattle. *Cornell Veter.*, 48, 1958, s. 458-495.
- KUBÍČEK, O. - KUBÍČKOVÁ, S. - ŠTĚPÁNEK, J. - NEZVAL, J. - PŠIKAL, I.: Detection of IBR virus using DNA hybridization. In: Seminar on biotechnology in veterinary medicine, Brno, 1991, s. 19-20.
- MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y. 1982.
- McKERCHER, D. G.: Infectious bovine rhinotracheitis. *Adv. veter. Sci.*, 4, 1959, s. 299-328.
- McKERCHER, D. G. - MOULTON, J. E. - MADIN, S. H.: Infectious bovine rhinotracheitis - a newly recognized virus disease of cattle. *Amer. J. veter. Res.*, 18, 1957, s. 246-256.
- PACCIARINI, M. - AGRESTI, A. - DESIMONE, F. - POLI, G. - TORRETTA, E. - SICCARDI, A. G. - MENEVERI, R. - GINELLI, F.: Detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) semen infectious by a dot-blot hybridization assay. *Brit. veter. J.*, 144, 1988, s. 55-63.
- PAUL, P. S.: Applications of nucleic acid probes in veterinary infectious diseases. *Veter. Microbiol.*, 24, 1990, s. 409-417.
- PETTERSON, V. - HYYPIÄ, T.: Nucleic acid hybridization - an alternative tool in diagnostic microbiology. *Immunol. Today*, 6, 1985, s. 268-272.
- POSPÍŠIL, Z. - MENŠÍK, J. - KREJČÍ, J. - ŠTĚPÁNEK, J.: Strategie ozdravovacího postupu od infekční bovinní rinotracheitidy. *Veterinářství*, 42, 1992, s. 15-17.
- ROCK, D. L. - HAGEMOSER, W. A. - OSORIO, F. A. - REED, D. E.: Detection bovine herpesvirus type 1 RNA in trigeminal ganglia of latently infected rabbits by in situ hybridization. *J. gen. Virol.*, 67, 1986, s. 2515-2520.
- SAIKI, R. K. - SCHARF, S. - FALOONA, F. - MULLIS, K. B. - HORN, G. T. - EHRLICH, H. A. - ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*, 230, 1985, s. 1350-1354.
- VAN DONKERSGORD, J. - BABIUK, L.: Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. *Veter. Med.*, 1991, s. 86-94.
- VILČEK, Š.: Detection of the bovine herpesvirus-1 genome by PCR method. *J. virol. Meth.*, 1993 (v tlači).
- VILČEK, Š. - DELIOVÁ, I. - FORGÁČ, O. - TAKÁCSOVÁ, I. - STROJNÝ, J. - BENKO, G.: Využitie molekulárno-genetických metód na detekciu infekčných patogénov zvierat [Záverčná správa.], Košice, ÚEVM 1992. s. 51.
- VISCIDI, R. P. - YOLKEN, R. G.: Molecular diagnosis of infectious diseases by nucleic acid hybridization. *Molec. cell. Probe*, 1, 1987, s. 3-14.
- WHITBECK, J. C. - BELLO, L. J. - LAWRENCE, W. C.: Comparison of the bovine herpesvirus 1 gl gene and the herpes simplex virus type 1 gB gene. *J. Virol.*, 62, 1988, s. 3319-3327.
- ŽUFFA, A. - BRÁNYIK, A. - ČERNÍK, K. - SALAJ, J.: Protection against experimental infection of calves vaccinated intranasally by three attenuated strains of IBR virus. *Zbl. Veter.-Med.*, 29, 1982, s. 413-425.
- ŽUFFA, A. - ZAJAC, J. - ŽUFFA, T.: Porovnanie imunizačnej účinnosti subjednotkovej a vírusovej inaktivovanej olejovej vakcíny proti infekčnej rinotracheitide hovädzieho dobytku. *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986, s. 209-218.

Došlo 31. 8. 1992

VILČEK, Š. - DELIOVÁ, I. - FORGÁČ, O. - STROJNÝ, L. - HARVAN, M. - BENKO, G. (University of Veterinary Medicine, Košice; Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice; State Veterinary Institute, Košice):

Detection of bovine herpesvirus-1 by the dot-blot hybridization method.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (4): 193-202.

With the development of molecular biology in the 1980s methods of microorganism detection start to innovate. One of the main advantages of the molecular-genetic methods, namely hybridization of nucleic acids and PCR methods, is the detection of genome of microorganism without the need for cellular cultivation.

To detect BHV-1 (etiopathological agents IBR-IPV) the dot-blot hybridization method on nitrocellulose filters was used together with different types of DNA probes (two-fiber recombinant plasmids, one-fiber recombinant phages M 13 and 40 bp synthetic oligonucleotide). Genome DNA BHV-1 was isolated from samples (virions, infested cells, nasal smears and secretions by phenol extraction). The highest sensitivity of detection was achieved with ^{32}P -pUR-1 probe (1.8kb random EcoRI - Hind III fragment ligated into plasmid pUC 9) which detected genome BHV-1 in 5.10^3 infested MDBK cells. This probe did not respond with herpes viruses BHV-2, BHV-3, BHV-4 and the virus of Aujeszky's disease. The quality of pUR-1 probe was further tested for IBR diagnostics in animals experimentally infested with the virus BHV-1 (intranasal infection). BHV-1 could be detected in nasal smears and secretions in experimentally infested calves as early as on the first day following infection, while the agents amount reached its peak on the days 2-3 and on the days 6-7 the occurrence of virus fell markedly. When digoxigenin-pUR-1, i.e. non-radioactively marked probe, the virus presence was confirmed only on the days 2-3, in the time of the highest occurrence of infection agents. To detect the virus through the dot-blot hybridization nasal secretions were confirmed as better compared with nasal smears. The technology of virus isolation on cell cultures confirmed also the occurrence of agents as soon as on the first day from infection, with maximum on the days 2-5, but much more reliably it detected the virus on the days observed from the day 3 and their peak was obtained on the day 6 from infection.

Experiments, comparing classical methods of IBR diagnostics (detection of specific antibodies, the method of isolation on cellular cultures) with the dot-blot hybridization using the samples obtained from farms with natural occurrence of IBM, are under progress.

bovine herpesvirus-1; BHV-1; DNA-probes; dot-blot hybridization; nitrocellulose membranes; IBR

Contact Address:

Ing. Štefan Vilček, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73,
041 81 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 32111-15, fax 095 767675

PREVENTÍVNE A METAFYLAKTICKÉ POUŽITIE PREPARÁTOV ALGA A ALGALEV PRI DIARHOICKOM, RESP. RESPIRAČNOM SYNDRÓME

Š. Paulík¹, E. Slanina¹, J. Dubaj², Š. Széchenyi², G. Benko³

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

²MEVAK a. s., Nitra

³Štátny veterinárny ústav, Košice

Vyvinuli sme dva gamaglobulínové preparáty-Alga (10% injekčný roztok sérového hovädzieho gamaglobulínu a albumínu) a Algalev (s prídavkom levamizolu 10 mg/ml; patentove chránený - PV 4069/87), pri ktorých hodnotíme použitie u teliat za terénnych podmienok. Preparát Alga mal v dávke 1 ml/kg živej hmotnosti (aplikovaná dvakrát) dobrý preventívny účinok pri diarhoickom syndróme u novorodených hypogamaglobulinemických teliat. V porovnaní k neošetreným tefatám bola preukázaná nižšia incidencia hnačky (41 % oproti 75 %; tab. I), jej neskoršie prepuknutie (o 24 h), kratšie trvanie (o 50 h; $P < 0,01$), slabšia intenzita a terapeuticky lepšia zvládnuteľnosť (tab. II). Preparát Algalev (aplikovaný dvakrát, v dávke 1 ml/kg živej hmotnosti) bol vhodný pre metafylaktické použitie (v spojitosti s aplikáciou antibiotík) pri respiračnom syndróme teliat. V porovnaní k tefatám neošetreným bola zaznamenaná nižšia incidencia ochorenia (42 % oproti 78 %), miernejšia intenzita klinických príznakov (výrazné príznaky u 20 % oproti 72 % teliat) a citeľne vyššie denné prírastky živej hmotnosti (0,64 kg oproti 0,26 kg; obr. 3). Koncentrácia celkových sérových Ig (CS-Ig) sérových bielkovín (SB) a sérového albumínu (S-Alb) bola u porovnávaných skupín teliat podobná počas celého pozorovacieho obdobia (obr. 1). Rozdielnosť pri sledovaných špecifických sérových protilátkach bola zistená v dynamike titru anti-PI 3 sérových protilátok (obr. 2); úroveň ich vývoja korešpondovala u oboch skupín teliat s incidenciou morbiditu a intenzitou klinických príznakov ochorenia.

tefatá; diarhoický a respiračný syndróm; gamaglobulínové preparáty; levamizol; morbidita; prírastky živej hmotnosti; sérové imunoglobulíny; bielkoviny a albumín; špecifické sérové protilátky PI-3, IBR a Adeno-1

Vývoj a zdravie teliat sú podstatne závislé na úrovni kolostrálnej výživy. Tefatá s nedostatočnou vybavenosťou materskými imunoglobulínami prejavujú zníženú odolnosť nielen voči neonatálnym infekciám (koliseptikémie a koli enteritídy, resp. enterovírusové hnačky; McEwana i., 1970a; Woode, 1978 a ďalší), ale aj ochoreniam v pozdejšom veku, hlavne infekciám dýchacieho aparátu (Williams a i., 1975; Davidson a i., 1981 a ďalší).

Pri výskyte uvedených syndrómov dochádza k stratám nielen v dôsledku zvýšeného úhynu, ale aj k zníženej intenzite rastu (Slanina, 1988). Preto redukcia chorobnosti a dĺžky jej trvania má značný ekonomický dosah. Intenzita imunitnej

reakcie je po aktívnej imunizácii u teliat v prvých týždňoch života slabá (Steinbach, 1973; Žuffa a Menšík, 1983; Žuffa a Salaj, 1984 - cit. Bouda, 1988). V našich podmienkach bolo zistené, že až 75 % z vyšetrených teliat v prvých dňoch po narodení je hypogamaglobulinemických (Paulík a i., 1983; Bouda a i., 1985). Z uvedených dôvodov sa v potencovaní obranyschopnosti teliat začínajú čoraz viac využívať poznatky pasívnej, resp. aktívnej nešpecifickej imunomodulácie.

Cieľom práce bolo overiť možnosť použitia gamaglobulínového preparátu (Alga) v prevencii diarhoického syndrómu a jeho kombinácie s levamizolom (Algalev) v metafylaxii pri respiračnom syndróme za podmienok praxe.

MATERIÁL A METÓDA

EXPERIMENT 1

32 klinicky zdravých novorodených teliat (slovenský strakatý x čiernostrakatý) o živej hmotnosti 35 - 40 kg bolo rozdelených do pokusnej (P; $n = 22$, priemerný vek 1,5 dňa) a kontrolnej (K; $n = 10$, vek 1 deň) skupiny. Tefatá boli umiestnené v individuálnych klietkach v profylaktóriu počas 20dňového pozorovacieho obdobia, kŕmené trikrát denne mliečivom matky a neskôr mliekom. Tefatá neboli ošetrované žiadnym preparátom; matky neboli vakcinované.

Pokusným tefatám bol intramuskulárne aplikovaný preparát Alga-10% injekčný roztok sérového hovädzieho gamaglobulínu (60 %) a albumínu (40 %), dvakrát s odstupom 72 h, v dávke 1 ml/kg živej hmotnosti.

Klinické pozorovanie bolo zamerané na sledovanie veku pri vzniku hnačky, jej intenzitu a trvanie. Podľa závažnosti klinických príznakov boli tefatá liečené tromi postupmi, t. j.: terapiou komplexnou (diéta, rehydratácia, antibiotiká, Dextran Spofa, adsorbencia), terapiou bez diéty a terapiou len za použitia Dextranu Spofa (inj. 6% roztok). Laboratórne boli sledované celkové sérové Ig (CS-Ig; McEwana i., 1970b), celkové sérové bielkoviny (CB; Bio-La-test); vzorky feces a rektálne výtery od hnačkujúcich teliat boli podrobené baktériologickému a virologickému vyšetreniu. Vzorky krvi boli odoberané z *vena jugularis* pred 1. aplikáciou, 72 h po 1. a 2. aplikácii preparátu a 20. deň sledovania.

EXPERIMENT 2

21 klinicky zdravých teliat (slovenský strakatý x čiernostrakatý) vo veku 6 až 8 týždňov bolo rozdelených do pokusnej (P; $n = 12$, priemerná ž. h. 65,2 kg) a kontrolnej (K; $n = 9$, priemerná ž. h. 68,5 kg) skupiny. Tefatá boli ustájené v dvoch kotercoch v jednej sekcii tefatníka (sekcia pozostávala zo 4 kotercoch s 16 až 20 tefatami), napájané dvakrát denne (Laktavit), s prídavkom TKŠ (0,6 kg na kus a deň) a sena horšej kvality (*ad libitum*). V čase započatia experimentu boli u niekoľkých teliat v sekcii pozorované klinické príznaky respiračného syndrómu. V ustajňovacom priestore boli nevyhovujúce zoohygienické podmienky (vysoká RV a vysoká koncentrácia amoniaku).

Pokusným tefatám bol intramuskulárne v dávke 1 ml/kg, dvakrát s odstupom 5 dní aplikovaný preparát Algalev, ktorý svojím zložením (chránené PV-4069-87)

predstavoval 10% injekčný roztok sérového hovädzieho gamaglobulínu (60 %) a albumínu (40 %), s prídavkom levamizolu 10 mg/ml.

Počas pozorovacieho obdobia (6 týždňov, t. j. v priemere vo veku 7 - 13 týždňov) bolo robené klinické (chorobnosť, prírastky ž. h.) a laboratórne sledovanie. Laboratórne boli vyšetrované CS-Ig (M c E w a n a i., 1970 b), CB (Bio-La-test), sérový albumín (S-Alb; fluorometricky na prístroji JASCO FP 550) a titer špecifických sérových protilátok PI-3, IBR a Adeno-1.

Štatistické hodnotenie: Studentov *t*-test (*St*-test) - P o l á č e k (1984).

VÝSLEDKY

EXPERIMENT 1

Počiatková koncentrácia CS-Ig a CB u oboch skupín teliat bola podobná a poukazovala na stredný stupeň hypogamaglobulinémiu ($P = 12,1 \pm 7,8$ U ZST; $K = 12,4 \pm 8,9$ U ZST) a miernu hypoproteinémiu ($P = 50,2 \pm 10,0$ g/l; $K = 51,5 \pm 12,9$ g/l). Počas pozorovacieho obdobia došlo k prepuknutiu hnačky u 32 % teliat pokusnej skupiny a až u 80 % kontrolných teliat, hoci vzhľadom na ich úroveň CS-Ig ($P = 7,4 \pm 5,4$ U ZST; $K = 12,6 \pm 10,2$ U ZST) a CB ($P = 46,2 \pm 4,8$ g/l; $K = 51,2 \pm 14,5$ g/l) boli kontrolné teľatá vo výhode ($P < 0,05$). Pretože u oboch skupín teliat sa vyskytovali aj teľatá normogamaglobulinemické (23 % pokusných teliat v rámci nehnačkujúcich; 20 % kontrolných teliat v rámci hnačkujúcich), objektívnejšie posúdenie preventívneho účinku preparátu bude pri zohľadnení len hypogamaglobulinemických teliat (tab. I). Aj napriek tomu, že ich percento bolo u porovnávaných skupín takmer zhodné ($P = 77$ %; $K = 80$ %), v rámci pokusnej skupiny teliat zostalo zdravých 59 %, zatiaľ čo u kontrol len 25 %. Výsledky klinického pozorovania sú uvedené v tab. II. Uvedené ukazovatele poukazujú na priaznivejšie hodnotenie u teliat, ktorým bol aplikovaný preparát Alga. U oboch skupín teliat úroveň priemernej koncentrácie CS-Ig a CB preukázala v jednotlivých termínoch sledovania podobný klesajúci trend, bez štatistickej významnosti ($P > 0,05$). U hnačkujúcich teliat boli diagnostikované *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, rota a corona vírusy. K úhynu nedošlo.

EXPERIMENT 2

Hodnoty sledovaných ukazovateľov imunobiokovového profilu (CS-Ig, CB, S-Alb.) preukázali počas pozorovacieho obdobia u oboch skupín teliat podobný trend, bez podstatných rozdielov ($P > 0,05$) v jednotlivých termínoch sledovania (obr. 1). Z hľadiska počiatkovej koncentrácie uvedených ukazovateľov bolo možné na začiatku experimentu teľatá charakterizovať ako normo-proteinemické, -gamaglobulinemické a -albuminemické. V ďalších termínoch sledovania sa situácia v tomto smere nezmenila. Pri sledovaní titra špecifických sérových protilátok bola na začiatku experimentu najvyššia úroveň zaznamenaná v poradí PI-3 ($P = 1 : 152 \pm 90,1$; $K = 1 : 152 \pm 111,8$), IBR ($P = 1 : 11,5 \pm 10,6$; $K = 1 : 60,0 \pm 81,9$) a Adeno-1 ($P = 1 : 2,0 \pm 5,6$; $K = 1 : 1,0 \pm 1,9$). V ďalších termínoch bol u oboch skupín teliat zistený pokles do nulových hodnôt pri IBR (v 10. týždni veku); špecifické protilátky Adeno-1 po prechodnom vzostupe ($K = 16,3 \pm 20,2$; $P = 41,0 \pm 25,5$) preukázali na záver experimentu (v 13. týždni veku) takmer úroveň počiatkových

I. Výskyt diarhoického syndrómu u hypogamaglobulinemických teliat po preventívnom použití preparátu Alga - The incidence of diarrhoeic syndrome in hypogammaglobulinaemic calves after preventive administration of the Alga preparation

Skupina ¹	CS-Ig (U ZST)	CB (g/l)	n	%
Spolu ²	9,2 ± 6,1	45,9 ± 5,8	17	77,3 ^a
P NHN	10,4 ± 6,4	45,7 ± 6,7	10	58,8 ^b
HN	7,4 ± 5,4	46,2 ± 4,8	7	41,2 ^b
Spolu ²	8,9 ± 5,6	46,5 ± 7,3	8	80,0 ^a
K NHN	11,8 ± 1,5	52,3 ± 3,3	2	25,0 ^b
HN	7,9 ± 6,2	44,5 ± 7,3	6	75,0 ^b

CS-Ig = celkové sérové Ig; CB = celkové bielkoviny, NHN = nehnačkujúce tefatá, NH = hnačkujúce tefatá; a = z celkového počtu pozorovaných teliat, b = z počtu hypogamaglobulinemických teliat, P = pokusná skupina, K = kontrolná skupina - CS-Ig = total serum Ig; CB = total proteins, NHN = nondiarrhoeic calves, NH = diarrhoeic calves; a = of the total number of observed calves, b = of the number of hypogammaglobulinaemic calves, P = experimental group, K = control group

¹ group, ² total

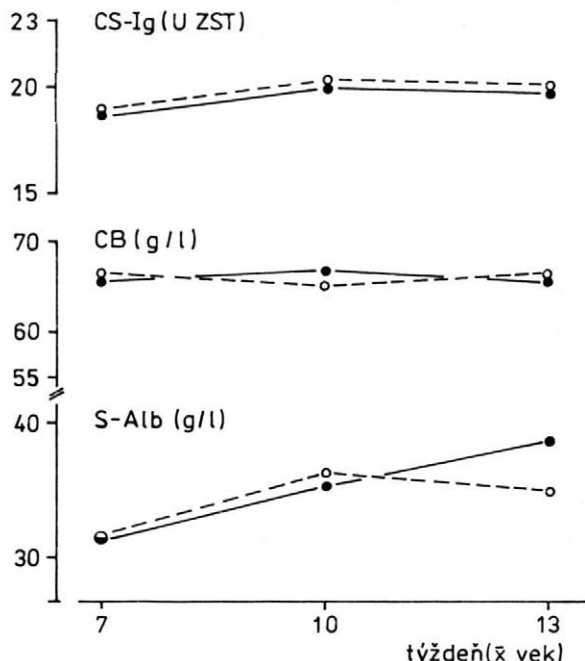
II. Klinické sledovanie pri diarhoickom syndróme teliat po preventívnom použití preparátu Alga; Studentov *t*-test; a = $P < 0,01$ - The clinical examination at the diarrhoeic syndrome of calves after preventive administration of the Alga preparation; Student's *t*-test; a = $P < 0.01$

Pozorované ukazovatele ¹	Skupina ¹²	
	Pokusná ¹³	Kontrolná ¹⁴
Priemerný vek pri vzniku hnačky (dni) ²	4,0 ± 1,9	2,9 ± 1,7
Priemerná doba trvania hnačky (dni) ³	2,1 ± 1,5	4,4 ± 0,7 ^a
Intenzita hnačky ⁴ - % (n)		
silná ⁵	14,3 (1)	62,5 (5)
stredná ⁶	0,0	37,5 (3)
slabá ⁷	85,7 (6)	0,0
Terapia ⁸ - % (n)		
komplexná ⁹	14,3 (1)	100 (8)
bez diéty ¹⁰	14,3 (1)	0,0
dextran ¹¹	71,4 (5)	0,0

¹ observed indicators, ² average age at diarrhoea onset (days), ³ average duration of diarrhoea (days), ⁴ diarrhoea intensity, ⁵ high, ⁶ medium, ⁷ low, ⁸ therapy, ⁹ complex, ¹⁰ without dietary regimen, ¹¹ dextran, ¹² group, ¹³ experimental, ¹⁴ control

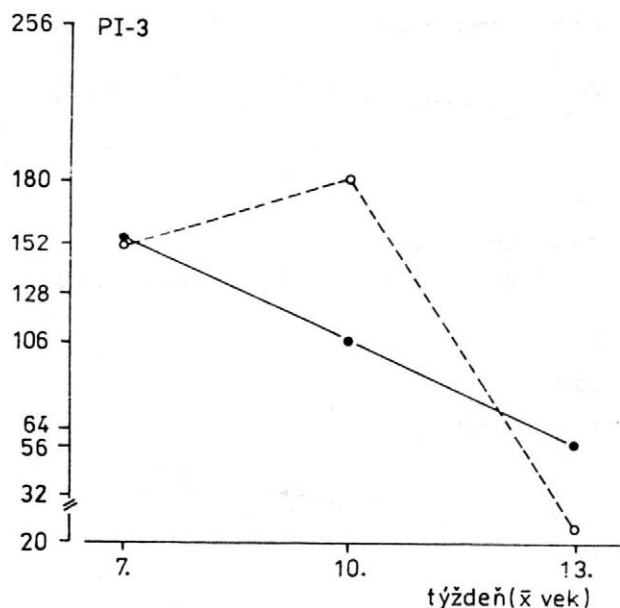
1. Úroveň ukazovateľov imunobiokovínového profilu u teliat po ošetrení preparátom Algalev - The level of the immune protein profile parameters in calves after administration of the Algalev preparation

Vysvetlivky pre obr. 1 - 3 - Explanatory notes to Figs. 1 - 3:
 ●—● pokusná skupina - experimental group
 ○—○ kontrolná skupina - control group
 týždeň ($\bar{x}$ vek) - week ($\bar{x}$ age)



hodnôt. Rozdielna dynamika titru bola zaznamenaná pri špecifických sérových protilátkach PI-3. Kým u pokusných teliat preukazovali v priebehu celého sledovaného obdobia pokles (2. odber = $106,0 \pm 98,6$; 3. odber = $56,0 \pm 37,4$), u teliat kontrolnej skupiny bol pozorovaný vo veku 10 týždňov ich vzostup ($1 : 180,0 \pm 105,4$) a následne rapidný pokles do nižších titrov ($1 : 22,4 \pm 27,9$), ako u pokusnej skupiny teliat (obr. 2).

Prvé klinické príznaky respiračného syndrómu v rámci sledovaných teliat sa objavili na 4. deň pozorovania ($P = 2$ ks; $K = 2$ ks); to nasvedčovalo, že ochorenie bolo v čase započatia experimentu v inkubačnom štádiu. V 5. deň ($P = 4$ ks; $K = 5$ ks) a 6. deň ($P = 5$ ks; $K = 7$ ks) sledovania sa počet teliat s klinickými príznakmi ochoreniami zvýšil. U jedného teľaťa z nich v pokusnej skupine a u piatich (t. j. 72 %) v skupine kontrolnej boli zistené výrazné príznaky respiračného syndrómu (zrýchlené dýchanie, bolestivý a vlhký kašeľ, purulentný výtok z nosdier, telesná teplota $40 - 41^\circ\text{C}$, apatia, inapetencia). Po preliečení teliat (Penstrepenten inj.), ktoré bolo zrealizované v celej sekcii teľatníka, klinické príznaky postupne ustúpili a bol pozorovaný len sporadický výskyt kašľa, hlavne pri prehánaní teliat. Táto zdravotná situácia sa udržala až do konca sledovania. Za pozorované obdobie ochorelo teda z pokusnej skupiny 42 % a z kontrolnej skupiny 78 % teliat. Úhyn v rámci sledovaných teliat nebol zaznamenaný. Sledovanie prírastkov živej hmotnosti na kus a deň preukázalo pozitívnu bilanciu pre teľatá pokusnej skupiny. Kým u teliat kontrolnej skupiny bol prírastok $0,26$ kg na kus a deň, u pokusných teliat to predstavovalo $0,64$ kg (obr. 3).



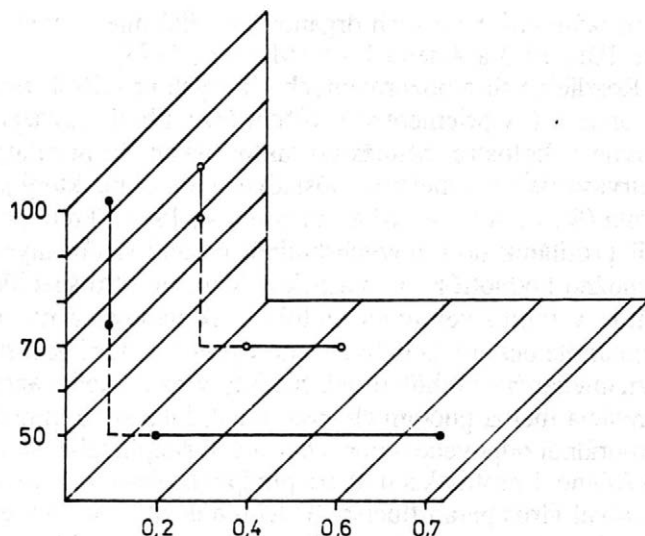
2. Dynamika titru špecifických protilátok PI-3 u teliat po ošetrení preparátom Algalev - The dynamics of the titre of specific antibodies PI-3 in calves after administration of the Algalev preparation

DISKUSIA

Pre vysoký výskyt hypogamaglobulinémie u teliat sa čoraz viac do popredia dostáva pasívna ochrana prostredníctvom gamaglobulínových prípravkov. Podstata ich účinku nie je dostatočne objasnená. Z hľadiska saturácie hypogamaglobulinémie sa u nás skúšané gamaglobulínové preparáty (GP) neosvedčili (J í l e k a i., 1983; P a u l í k a S l a n i n a, 1985) hoci ich efekt na zdravotný stav teliat bol zaznamenaný (K r u p k a a i., 1981; T l u č k o ř a K o m á r e k, 1983).

Skúšaný preparát Alga preukázal dobrý preventívny účinok pri diarhoickom syndróme novorodených teliat, poukazoval na to výskyt hnačiek až u 80 % kontrolných teliat a len u 32 % teliat ošetrených uvedeným preparátom. Po jeho aplikácii sme podobne ako v našich predošlých pozorovaniach s GP (P a u l í k, 1983) nezaznamenali výraznejšie kvantitatívne ovplyvnenie sledovaných parametrov imunobiokovínového profilu v porovnaní s kontrolnými teľatami. T l u č k o ř a K o m á r e k (19873) však uvádzajú, že zníženie morbidita a mortality teliat po aplikácii (dvakrát po 15 ml s odstupom 14 dní) nešpecifického sérového GP záviselo okrem zlepšenia zoohygienických a dietetických podmienok, aj od vzostupu koncentrácie sérového IgG. Naše sledovania (P a u l í k a S l a n i n a, 1985; S l a n i n a a i., 1986) v tomto smere však ukázali, že aplikácia aj niekoľkonásobne väčších dávok GP podstatnejšie neovplyvní koncentráciu sérových Ig. Podobné výsledky u teliat boli prezentované aj inými (R a d o m i ř s k í a Ž m u d z i ř s k í, 1973; S t a p l e s a G r a h a m, 1981).

3. Prírastok živej hmotnosti (Pžh) u teliat po ošetrení preparátom Algalev; osa x - Pžh v kg na kus a deň, osa y - Pžh v kg na kus za sledované obdobie - The weight gains (Pžh) in calves after administration of the Algalev preparation; x - axis - Pžh in kg per head/day, y - axis - Pžh in kg per head over the period of investigation



Aj napriek tomu má použitie GP svoje opodstatnenie, a to v chovoch teliat s vysokou incidenciou hypogamaglobulinémie. Ich pozitívny efekt bol zaznamenaný nielen v redukcii výskytu morbidity a mortality (Radomiński a Žmudzinski 1973; Krupka a i., 1981; Slanina a i., 1986 a ďalší), ale aj v ovplyvnení intenzity klinických príznakov po prepuknutí ochorenia (Draghici a i., 1969; McBeath, 1977 a ďalší). Pri preventívnej aplikácii preparátu Alga sme okrem zníženého výskytu a slabšej intenzity hnačiek zaznamenali aj jej nejskoršie započatie a kratšie trvanie ochorenia, v porovnaní s kontrolnými teľatami. Podobne aj Logan a Penhale (1971a,b) a Logan a i. (1974) zistili po preventívnom použití GP (na báze IgM imunoglobulínu) neskoršie prepuknutie ochorenia (hnačky, septikémie), ako aj dlhšiu životnosť novorodených bezkolostrálnych teliat po experimentálnej alebo prirodzenej koliinfekcii.

Pri overovaní preparátu Alga boli medzi porovnávanými skupinami teliat rozdiely aj v použitej terapii započatej po prepuknutí hnačky. Kým pri kontrolných hnačkujúcich teľatách bola nutná komplexná terapia (diéta, adstringencia, rehydratácia a antibiotická terapia) u väčšiny pokusných hnačkujúcich teliat (71 %) postačovalo ošetrenie len 6% roztokom dextranu (Dextran Spofa). Matul a i. (1971) na základe svojich experimentov tiež uvádzajú, že nešpecifický gamaglobulín je spolu s inými liečivami účinným prostriedkom profylaxie a terapie pri dyspepsii u teliat. Vhodnosť preventívneho použitia nešpecifického GP, so súčasnou úpravou úrovne veterinárno-chovateľského režimu, k redukcii incidencie mortality novorodených teliat vyplýva aj z práce Krupka a i. (1981).

Respiračný syndróm patrí k tým ochoreniam u teliat, ktoré sa v značnej miere podieľajú na ekonomických stratách pri ich odchove. U hľadiska chorobnosti a stratovosti teliat stojí respiračný syndróm na poprednom mieste v 2. až 3. mesiaci ich života (Slanina a i., 1991). V rámci vírusových pôvodcov komplexu zápalu-

vých ochorení dýchacích orgánov dôležité miesto v etiopatogenéze prináleží vírusom IBR, PI-3 a Adeno 1 - 8 (M a y r , 1978).

Rozdielne titre pozorovaných sérových protilátok zaznamenané na začiatku sledovania, t. j. v priemere v 7. týždni života boli pravdepodobne odrazom ich rôznej úrovne v kolostre. Množstvo takto získaných protilátok určuje taktiež dobu ich pretrvávania a v konečnom dôsledku aj ich zánik, ktorý je viazaný na 2. až 4. mesiac života (S t r a u b a M a t t h a e u s , 1978). Preto pokles špecifických sérových IBR protilátok do nulových hodnôt u nami sledovaných teliat v 10. týždni života je možno hodnotiť z tohto aspektu. Vzostup titru špecifických PI-3 a Adeno-1 protilátok v tomto vekovom období však napovedá na aktívnu imunitnú odpoveď. Vzplanutie ochorenia bolo zistené v prvom týždni pozorovania, t. j. dva týždne pred zaznamenaným vrcholom ich hladiny v nami sledovanej časovej dynamike. Určitá korelácia medzi počtom chorých teliat, intenzitou klinických príznakov a vývojom humorálnej odpovede u porovnávaných skupín teliat sa vyskytovala pri PI-3, ale nie pri Adeno-1 protilátkach. Preto predpokladáme, že primárnu úlohu v etiopatogenéze zohrával vírus parainfluenzy-3. Jeho dôležité miesto v etiopatogenéze respiračného syndrómu bolo preukázané (B r y s o n a i. , 1979a,b a ďalší). Imunitná odpoveď prejavujúca sa vzostupom titru špecifických PI-3 sérových protilátok je diagnostickým ukazovateľom prebiehajúcej infekcie (M a r s h a l l , 1981), alebo vakcinačnej efektívnosti (P r o b e r t , 1978). Hoci pri diagnostike ochorenia neboli zahrnuté izolačné postupy, nevylučujeme spoluúčasť aj niektorého z možných bakteriálnych pôvodcov; nepriamo tomu nasvedčovali klinické príznaky (vlhký kašeľ, hnisavý výtok z nosa) ochorenia a ich následný ústup po antibiotickej terapii.

Pri teľatách, ktorým bol aplikovaný Algalev bola zaznamenaná nižšia incidencia ochorenia ($P = 42\%$; $K = 78\%$) a miernejšia intenzita prebiehajúcich klinických príznakov (výrazné príznaky u pokusných boli u 20% a u kontrolných u 72% teliat). V porovnaní ku kontrolným teľatám bola zaznamenaná opačná tendencia (t. j. pokles) v dynamike titru špecifických sérových PI-3 protilátok k 10. týždňu života, t. j. v priebehu 2 týždňov po prepuknutí klinickej formy ochorenia. Tieto skutočnosti jasne poukazujú, že teľatá po aplikácii Algalevu disponovali vyššou obranyschopnosťou. Pretože sérové protilátky môžu redukovať intenzitu ochorenia u teliat pri PI-3 infekcii, ale nebránia infekcii a manifestácii klinických príznakov (F r a n k a M a r s h a l l , 1971), výrazný rozdiel v morbidite v prospech pokusných teliat napovedá, že na obrane sa podieľali aj iné zložky imunity než protilátky.

V obrane proti mnohým vírusovým infekciám dôležitú úlohu zohráva aj bunkou sprostredkovaná imunita (BSI) (C o o k a S p l i t t e r , 1989). Táto participuje aj v imunitnej odpovedi pri PI-3 infekcii (M o r e n o - L ó p e z a i. , 1976, M o r e n o - L ó p e z , 1977). Z bunčných zložiek obrany v tomto smere bola preukázaná cytolytická aktivita NK (natural killer) buniek (C a m p o s a i. , 1982) a alveolárnych makrofágov (S t o t t a i. , 1985); pri monocyt/makrofágovej populácii buniek sa predpokladá buď ich priamy účinok, alebo nimi sprostredkovaná aktivácia iných cytotoxických efektorových buniek (C a m p o s a i. , 1982). Špecifická lytická aktivita cytotoxických T lymfocytov bola preukázaná v imunitnej odpovedi

k IBR vírusu (S p l i t t e r a i., 1988); takýto dôkaz pri PI-3 imunitnej odpovedi zatiaľ postrádame.

Levamisol patrí k imunomodulačným látkam, ktoré potencujú aktivitu bunčných zložiek imunity, zahrňujúc aj uvedené bunky s cytotoxickou aktivitou. Navyiac bolo zistené, že funkčná aktivita NK buniek je potencovaná interferónom (B u r n s a i., 1985; C o l m e n a r e s a L ó p e z , 1986), t. j. cytokínom, ktorého produkcia (interferón gama) u hovädzieho dobytky je indukovaná levamisolom (B a b i u k a M i s r a , 1981). Preto pri nami zaznamenanom prospešnom metafylaktickom efekte preparátu Algalev u teliat s respiračným syndrómom je potrebné zohľadňovať aj tieto skutočnosti.

Zdravotná situácia je úzko spätá nielen s mortalitou, ale aj s úžitkovosťou teliat. Chorobnosť resp. dĺžka jej trvania, bola priaznivo ovplyvnená levamisolom nielen pri jeho preventívnom použití, ale aj pri jeho kombinácii s antibiotikami v terapii bronchopneumónie u teliat (P a k h o m o v , 1983). Takýto efekt bol preukázaný aj v našom sledovaní. Ľahší priebeh ochorenia u pokusných teliat sa okrem toho odzrkadlil aj vo vyšších prírastkoch živej hmotnosti v porovnaní ku teľatám kontrolnej skupiny. Denný prírastok živej hmotnosti u týchto teliat dosiahol len 41 % prírastku teliat ošetrovaných preparátom Algalev, čo predstavovalo redukciu hmotnosti za sledované obdobie o 15,7 kg na teľa. Podobnú analýzu strát v úžitkovosti teliat pri respiračnom syndróme uvádza S l a n i n a a i. (1991).

L i t e r a t ú r a

- BABIUK, L. A. - MISRA, V.: Levamisole and bovine immunity: *in vitro* and *in vivo* effects on immune responses to herpesvirus immunization. *Can. J. Microbiol.*, 27, 1981, s. 1312-1319.
- BOUDA, J. - JAGOŠ, P.: Příčiny morbidit a ztrát u telat a možnosti jejich prevence. *Veterinářství*, 38, 1988, s. 16-18.
- BOUDA, J. - JAGOŠ, P. - KLIMEŠ, J. - DVOŘÁK, V.: Závislost hladiny imunoglobulinů v krevním séru telat na době, množství a kvalitě vypitého mleziva. *Veterinářství*, 35, 1985, s. 22-24.
- BRYSON, D. G. - McFERRAN, J. B. - BALL, H. J. - NEILL, S. D.: Observations on outbreaks of respiratory disease in calves associated with parainfluenza type 3 virus and respiratory syncytial virus infection. *Veter. Rec.*, 104, 1979a, s. 45-49.
- BRYSON, D. G. - McNULTY, M. S. - BALL, H. J. - NEILL, S. D. - CONNOR, T. J. - CUSH, P. F.: The experimental production of pneumonia in calves by intranasal inoculation of parainfluenza type III virus. *Veter. Rec.*, 105, 1979b, s. 566-573.
- BURNS, G. F. - BEGLEY, C. G. - MACKAY, I. R. - TRIGLIA, T. - WERMEISTER, J. A.: „Supernatural“ killer cells. *Immunol. Today*, 6, 1985, s. 370-373.
- CAMPOS, M. - ROSSI, C. R. - LAWMAN, M. J. P.: Natural cell mediated cytotoxicity of bovine mononuclear cells against virus-infected cells. *Infect. Immunol.*, 36, 1982, s. 1054-1059.
- COLMENARES, C. - LÓPEZ, C.: Enhanced lysis of herpes simplex virus type 1 - infected mouse cell lines by NC and NK effectors. *J. Immunol.*, 136, 1986, s. 3473-3480.
- COOK, C. G. - SPLITTER, G. A.: Comparison of bovine mononuclear cells with other species for cytolytic activity against virally-infected cells. *Veter. Immunol. Immunopathol.*, 20, 1989, s. 239-261.
- DÁVIDSON, J. N. - YANCEY, S. P. - CAMPBELL, S. G. - WARNER, R. G.: Relationship between serum immunoglobulin values and incidence of respiratory disease in calves. *JAVMA*, 179, 1981, s. 708-710.

- DRAGHICI, C. - LADANYI, L. - KLEMM, W.: Untersuchungen über den vorbeugenden Wert von Rinder-gammaglobulin bei Koliseptie der Kälber. *Mh. Veter. Med.*, 24, 1969, s. 621-623.
- FRANK, G. H. - MARSHALL, R. G.: Relationship of serum and nasal secretion-neutralizing antibodies in protection of calves against parainfluenza-3-virus. *Amer. J. veter. Res.*, 32, 1971, s. 1707-1713.
- JÍLEK, F. - DOBŠINSKÝ, O. - NOVOTNÝ, B.: Použití profylaktických preparátů na bázi nespecifických imunoglobulinů. *Veterinářství*, 33, 1983, s. 218-220.
- KRUPKA, V. KALÁB, D. - JURAN, E.: Ověřování účinku kolostrálního imunoglobulinového preparátu pro injekční aplikaci u telat za provozních podmínek. *Veterinářství*, 31, 1981, s. 18-19.
- LOGAN, E. F. - PENHALE, W. J.: Studies on the immunity of the calf to colibacillosis. III. The local protective activity of colostrum within the gastro-intestinal tract. *Veter. Rec.*, 89, 1971a, s. 628-632.
- LOGAN, E. F. - PENHALE, W. J.: Studies on the immunity of the calf to colibacillosis. IV. The prevention of experimental colisepticaemia by the i. v. administration of a bovine serum IgM-rich fraction. *Veter. Rec.*, 89, 1971b, s. 663-667.
- LOGAN, E. F. - STENHOUSE, A. - PENHALE, W. J. - ARMISHAW, M.: Studies on the immunity of the calf to colibacillosis. VI. The prophylactic use of a pooled serum. IgM-rich fraction under field conditions. *Veter. Rec.*, 94, 1974, s. 386-389.
- MARSHALL, R. G.: Antibody response of calves after intranasal inoculation with parainfluenza-3 virus and resistance of inoculated calves to experimental homologous viral infection. *Amer. J. veter. Res.*, 42, 1981, s. 907-911.
- MATUL, A. A. - DUCHNEVIČ, M. D. - ZAKORDANEC, A. A.: Primenenje nespecifičeskogo gamma-globulina pri dispepsii teljat. *Veterinarija*, 47, 1971, s. 83-84.
- MAYR, A.: Befämpfung der wichtigsten akuten Viruserkrankheiten des Kables in der Bundesrepublik Deutschland. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, 91, 1978, s. 181-186.
- McBEATH, D. G.: Prophylactic use of hyperimmune serum in experimental colisepticaemia in calves. *Veter. Rec.*, 100, 1977, s. 259-262.
- McEWAN, A. D. - FISHER, W. - SELMAN, J. E.: Observations on the immune globulin levels of neonatal calves and their relationship to disease. *J. Comp. Path.*, 80, 1970a, s. 259-265.
- McEWAN, A. D. - FISHER, E. W. - SELMAN, J. E.: An estimation of the efficiency of the absorption of immune globulins from colostrum by newborn calves. *Res. veter. Sci.*, 12, 1970b, s. 239-243.
- MORENO-LÓPEZ, J.: Cell-mediated immunity to parainfluenza-3 (PIV-3) in cattle. Evaluation of in vivo and in vitro tests. *Zbl. Vet. Med. B*, 24, 1977, s. 231-240.
- MORENO-LÓPEZ, J. - TÜRNVIST, M. - MÖLLERBERG, L. - MOREIN, B.: Skin hypersensitivity to parainfluenza-3 virus in cattle. II. Induction by vaccination and specificity. *Zbl. Veter. Med.*, R. B., 23, 1976, s. 801-808.
- PAKHOMOV, G. A.: Immunological reactivity of calves undergoing treatment with levamisole for acute bronchopneumonia. *Veter. Bull.*, 53, 1983, s. 678.
- PAULÍK, Š.: Štúdium prirodzenej a získanej odolnosti teliat v priemyselných podmienkach chovu. [Kandidátska dizertácia.] 1983, 250 s. - Vysoká škola veterinársksa.
- PAULÍK, Š. - SLANINA, L.: Experimentálne použitie gamaglobulínových prípravkov a ich vplyv na hladinu sérových imunoglobulínov u teliat. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985, s. 659-668.
- PAULÍK, Š. - SLANINA, L. - BOMBA, A. - POLÁČEK, M.: Imunobiokovínový profil teliat v zdravotne extrémnych podmienkach. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983, s. 669-678.
- POLÁČEK, M.: Základy biometrie pre veterinárnych lekárov, Bratislava, Prítoda 1984, 100 s.
- PROBERT, M. - STOTT, E. J. - THOMAS, L. H. - COLLINS, A. P. - JEBBETT, J.: An inactivated parainfluenza virus type 3 vaccine : the influence of vaccination regime on the response of calves and their subsequent resistance to challenge. *Res. veter. Sci.*, 24, 1978, s. 222-227.

- RADOMIŃSKI, W. - ŻMUDZINSKI, J.: Wpływ hipogamaglobulinemii na zachorowalność cielat. *Medycyna vet.*, 29, 1973, s. 223-225.
- SLANINA, L.: Produkcia a zdravie teliat zo súčasného a perspektívneho hľadiska. In: Zbor. VII. celoštátnej Konf. Zdravie a produkcia teliat v priemyselných podmienkach chovu. Bratislava, ÚVIO 1988, s. 11-15.
- SLANINA, L. a kol.: Zdravie a produkcia teliat, Bratislava, príroda 1991, 387 s.
- SLANINA, L. - PAULÍK, Š. - DUBAJ, J. - SZÉCHENYI, Š. - GREGOR, I.: Algelev inj. a. u. v. Prípravok na stimuláciu imunodeficiencií pri hospodárskych zvieratách. [Záverečná správa.] Košice, Vysoká škola veterinárna 1986, 144 s.
- SPLITTER, G. A. - ESKRA, L. - ABRUZZINI, A. F.: Cloned bovine cytolytic T cells recognize bovine herpesvirus 1 in a generically restricted, antigen specific manner. *Immunol.*, 63, 1988, s. 145-150.
- STAPLES, G. E. - GRAHAM, CH. K.: Changes in components of sera from calves after injections of adult bovine serum. *Veter. Med. small anim. Clin.*, 2, 1981, s. 243-246.
- STEINBACH, G.: Zum Einfluss des alters auf die humorale Immunantwort des Kalbes. *Mh. Veter. - Med.*, 17, 1973, s. 641-647.
- STOTT, E. J. - PROBERT, M. - THOMAS, L. H.: Cytotoxicity of alveolar macrophages for virus-infected cells. *Nature*, 255, 1975, s. 710-712.
- STRAUB, O. C. - MATTHAEUS, W.: The immunoglobulin composition of colostrum and the persistence of acquired immunoglobulins and specific antibodies in the calf. *Ann. Rech. vétér.*, 9, 1978, s. 269-275.
- TLUČKOŘ, V. - KOMÁREK, J.: Ověřování praktické účinnosti homologeních imunoglobulinů hovédního typu vyrobených Ústavem sér a očkovacích látek v Praze při odchovu telat. *Veterinářství*, 33, 1983, s. 221-224.
- WILLIAMS, M. R. - SPOONER, R. L. - THOMAS, L. H.: Quantitative studies on bovine immunoglobulins. *Veter. Rec.*, 96, 1975, s. 81-84.
- WOODE, G. N.: Epizootology of bovine rotavirus infection. *Veter. Rec.*, 103, 1978, s. 44-46.
- ŽUFFA, A. - MENŠÍK, J.: Návrh imunologického programu pre ochranu teliat proti vírusovým infekciám. In: Zbor. VI. celoštátnej Konf. Produkcia a zdravie teliat v priemyselných podmienkach chovu. Bratislava, Úvio 1983, s. 107-115.

Došlo 28. 12. 1992

PAULÍK, Š. - SLANINA, L. - DUBAJ, J. - SZÉCHENYI, Š. - BENKO, G. (University of Veterinary Medicine, Košice; MEVAK a.s. Nitra; State Veterinary Institute, Košice):

Preventive and metaphylactic administration of Alga and Algelev preparations in diarrhoeic and/or respiration syndrome.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (4): 203-214.

Two gammaglobulin preparations have been developed: Alga (10% injection solution of serum bovine gamma-globulin and albumin) and Algelev (with addition of levamisole 10 mg/ml, patented under PV 4069/87); their administration to calves in field conditions was evaluated. The Alga preparation at a rate of 1 ml/kg liveweight (two administrations) had good preventive effects in the diarrhoeic syndrome of new-born hypogammaglobulinaemic calves. In comparison with the untreated calves, these parameters were determined: lower incidence of diarrhoea (41 % against 75 %; Tab. I), its later onset (by 24 hours), shorter duration (by 50 hours; $P < 0.01$), lower intensity and easier therapeutic handling (Tab. II). The Algelev preparation (two administrations at a rate of 1 ml/kg liveweight) was suitable for metaphylactic use (combined with antibiotic application) in

the respiration syndrome of calves. In comparison with the untreated calves, these parameters were determined: lower incidence of this disorder (42 % against 78 %), lower intensity of clinical symptoms (intensive symptoms in 20 % of the calves against 72 %) and importantly higher daily weight gains (0.64 kg against 0.26 kg; Fig. 3). The concentrations of total serum Ig (CS-Ig), serum proteins (SB) and serum albumin (S-Alb) were similar in the compared groups of calves in the whole period of observation (Fig. 1). Certain differences were observed in the dynamics of anti-PI 3 titre of serum antibodies as shown by investigation of specific serum antibodies (Fig. 2); the level of their production was in agreement with morbidity incidence and clinical symptom intensity in both groups of calves.

calves; diarrhoeic and respiration syndromes; gamma-globulin preparations; levamisole; morbidity; liveweight gains; serum immunoglobulins, proteins and albumin; specific serum antibodies PI-3, IBR and Adeno-1

Contact Address:

MVDr. Štefan P a u l í k, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73,
041 81 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 32111-15, fax 095 767675

ÚČINNOST BR-TESTU A INTESTU PŘI STANOVENÍ REZIDUÍ CHEMOTERAPEUTIK V SYROVÉM A PREZERVovanÉM MLÉCE

D. Ryšánek, J. Schlegelová

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

Testace BR-testu (Enterotox) a INTESTU (Mlékárenský průmysl) probíhala v týdenních intervalech po dobu překračující o jeden týden deklarovanou expiraci, tj. u BR-TESTU v sedmi, u INTESTU v pěti opakováních. Chemoterapeutika byla vybrána podle četnosti jejich klinického použití, a to penicilin, streptomycin, oxacilin, chloramfenikol, oxytetracyklin a sulfadimidin. Byly testovány detekční limity, reprodukovatelnost stanovení, vliv prezervace mléka, byla ověřena deklarovaná expirace testů. Pro INTEST byly zjištěny tyto detekční limity ($\mu\text{g/ml}$): penicilin 0,005; streptomycin 0,5 - 10,0; oxacilin 0,1 - 0,3; chloramfenikol 10,0; oxytetracyklin 0,1 - 0,7 a sulfadimidin 50,0 - 500,0. BR-TEST vykázal citlivost pro streptomycin a chloramfenikol nižší než INTEST. Pro penicilin, oxacilin a oxytetracyklin někdy nižší, někdy shodnou. Naopak INTEST vykázal výrazně nižší citlivost pro detekci sulfadimidinu oproti BR-TESTU. Reprodukovatelnost detekce byla pro INTEST lepší než pro BR-TEST. Prezervace mléka Heeschovým činidlem neovlivnila detekční limity testů. Při použití prezervovaného mléka se doba reakce prodloužila přibližně o jednu hodinu. Oba testy byly funkční po dobu deklarované expirace.

mléko; prezervované mléko; redukční testy; rezidua chemoterapeutik; detekční limity; reprodukovatelnost; expirace

Směrnice Evropského společenství (EEC Council Directive 85/397) vymezila čtyři základní jakostní znaky syrového mléka. Jedním z nich jsou rezidua antibiotik v mléce. I když požadavky této směrnice jsou určeny pro regulaci tržní směny mléka a mléčných výrobků uvnitř Evropského společenství, není pochyb o tom, že budou zahrnuty do národních norem. Tento proces probíhá i v České republice. Z toho vyplynul v roce 1991 požadavek posoudit použitelnost dvou komerčně vyráběných mikrotitratičních testů, BR-TESTU (ENTEROTOX-SRN) a INTESTU (Mlékárenský průmysl-ČR), v laboratořích Státní veterinární správy a v Centrálních laboratořích mlékárenského průmyslu.

Rozhodujícím kritériem tohoto posouzení byly detekční limity testů. Literární údaje týkající se daného problému shrnuje tab. I. Dalšími kritérii bylo posouzení reprodukovatelnosti detekčních limitů, možnosti použití vzorků prezervovaných Heeschovým činidlem a ověření deklarované doby expirace testů. Tato publikace shrnuje dosažené výsledky.

MATERIÁL A METODY

K testaci byly použity kompaktní a dělené mikroplotny (STRIPY) BR-TEST „AS“, BR-TEST 12x8 „AS“ a INTEST typ C-96 a INTEST 0-96/6x16. Byl použit

I. Detekční limity terapeutik ($\mu\text{g/ml}$) v mléce v literárních údajích – Detection limits of therapeutics ($\mu\text{g/ml}$) in milk as mentioned in references

Pramen ¹	Testy a testovací kmeny ²	Terapeutika ³					
		Penicilin ⁴	Streptomycin ⁵	Oxacilin ⁶	Chloramfenikol ⁷	Oxytetracyklin ⁸	Sulfadimidin ⁹
Kraack a Tolle (1967)	<i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C 953	0,004	8,0	-	-	-	-
Schraudy a Rauscher (1972)	BR-test	0,003 - 0,001	10,0	1,0	5,0	-	-
Černá (1985)	<i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C 953	0,005	10,0	-	20,0	-	-
Ebrecht (1985)	BR-test Enterotox	0,004	12,0	-	5,0	0,400	-
Havlová a Jičínská (1987)	BR-test Enterotox	0,003	-	-	2,5	0,100	-
Sixl aj. (1990)	BR-test „AS“	0,002	3,0	-	3,0	0,200 - 0,300	0,100 - 0,500
	BR-test BLUE STAR	-	1,0 - 1,6	-	3,0	0,200 - 0,350	0,015 - 0,050
IDF (1991)	BR-test	0,004	13,0	-	15,0	0,500	1,000

¹source, ²tests and testing strains, ³therapeutics, ⁴penicillin, ⁵streptomycin, ⁶oxacillin, ⁷chloramphenicol, ⁸oxytetracycline, ⁹sulfadimidin

princip průkazů inhibice v koncentračních řadách vybraných terapeutik. Terapeutika byla zvolena s přihlédnutím k frekvenci jejich použití v klinické praxi v ČR.

Použitá terapeutika a koncentrační řady shrnuje tab. II. Na každou mikroplotnu byla nanášena úplná sestava koncentračních řad zvolených terapeutik jak v mléce neprezervovaném, tak v mléce prezervovaném Heeschovým činidlem.

Koncentrační řady byly připraveny ředěním zvolených terapeutik v syrovém kravském mléce, získaném od zdravé dojnice, jejíž mléčné žlázy byly kontrolovány mikrobiologickým a cytologickým vyšetřením sektretu. Ve smyslu doporučení fy ENTEROTOX bylo v tomto mléce kontrolováno pH tak, aby zvolený vzorek měl

II. Výběr terapeutik a koncentrační řady ($\mu\text{g/ml}$) použité při testaci – The choice of therapeutics and concentration series ($\mu\text{g/ml}$) used for the tests

<i>Benzylpenicilinum procainum</i>	0,100	0,020	0,015	0,010	0,005	0,001
<i>Streptomycinum sulfuricum</i>	10,0	2,0	1,5	1,0	0,5	0,1
<i>N,N-dibenzylethylendiamin oxacilinum</i>	100,0	10,0	1,0	0,5	0,3	0,1
<i>D-chloramphenicolum</i>	1000,0	100,0	40,0	20,0	10,0	1,0
<i>Oxytetracyclinum</i>	1000,0	100,0	10,0	1,0	0,7	0,1
<i>Sulfadimidinum natricum</i>	10000,0	5000,0	1000,0	500,0	50,0	10,0

hodnotu vyšší než pH 6. Ve smyslu doporučení I D F (1991) a fy Mlékárenský průmysl byla provedena tepelná inaktivace inhibitorů 5 min při teplotě 85 °C.

Při pipetování vzorků byly důsledně dodržovány zásady uváděné výrobcí diagnostik.

Inkubace probíhala ve vodní mikrolázni při teplotě 65 °C. Mikroplotny byly umístěny na vodní hladině adhezni fólií vzhůru. Vývoj reakce byl posuzován po třech, čtyřech a pěti hodinách. Za výsledné byly považovány reakce, které se při opakovaném posuzování dále neměnily. Hodnoceny byly plotny, u kterých negativní standard vykázal negativní reakci a pozitivní standardy pozitivní. Kde nebyla splněna tato podmínka, byla plotna označena za nefunkční.

Z experimentálních důvodů nebyly použity originální pozitivní standardy vyráběné oběma firmami, nýbrž standardy o koncentraci penicilinu 0,040 $\mu\text{g/ml}$ mléka a sulfadimidinu 500 $\mu\text{g/ml}$ mléka.

Pokus probíhal po dobu překračující o jeden týden deklarovanou expiraci, tj. u BR-TESTU sedm týdnů a u INTESTU pět týdnů. Testace byly prováděny jednou týdně.

VÝSLEDKY

DETEKČNÍ LIMITY

Tab. III shrnuje rozpětí detekčních limitů posuzovaných testů pro jednotlivá terapeutika v neprezervovaném mléce v období do deklarované expirace a v týdně po deklarované expiraci. Je z ní patrné, že BR-TEST vykázal v našich pokusech nižší citlivost pro streptomycin a chloramfenikol než INTEST; pro penicilin, oxacilin a oxytetracyklin někdy nižší, někdy shodnou. Naopak INTEST vykázal výrazně nižší citlivost pro detekci sulfadimidinu oproti BR-TESTU.

Tab. IV shrnuje rozpětí detekčních limitů posuzovaných testů pro jednotlivá terapeutika v mléce s Heeschenovým činidlem v období do deklarované expirace a v týdně po deklarované expiraci. Vyplývá z ní, že BR-TEST v našich pokusech vykázal citlivost na testovaná chemoterapeutika někdy nižší a někdy shodnou s citli-

III. Rozpětí detekčních limitů ($\mu\text{g/ml}$) v neprezervovaném mléce – The range of detection limits ($\mu\text{g/ml}$) in unpreserved milk

Testy ¹	Exspirace ²	Terapeutika ³					
		Penicilin ⁴	Streptomycin ⁵	Oxacilin ⁶	Chloramfenikol ⁷	Oxytetracyklin ⁸	Sulfadimidin ⁹
BR-test „AS“	DO	0,010 - 0,005	> 10,0	0,5 - 0,3	100,0	1,0 - 0,7	< 10,0
	PO	0,005	> 10,0	0,5	100,0	10,0	< 10,0
BR-test 12x8 „AS“	DO	0,010 - 0,005	> 10,0	0,5 - 0,3	100,0	1,0 - 0,7	< 10,0
	PO	0,010	> 10,0	0,5	100,0	10,0	< 10,0
INTEST C 96	DO	0,005	10,0 - 1,5	0,3 - < 0,1	10,0	0,7	500,0 - 50,0
	PO	0,005	10,0	0,3	10,0	0,7	500,0
INTEST 0-96/6x16	DO	0,005	1,5	0,3	10,0	0,7	500,0
	PO	0,005	0,5	0,3	10,0	0,7	500,0

¹tests, ²expiration; for 3 - 9 see Tab. I

vostí INTESTU. INTEST, obdobně jako u neprezervovaného mléka, vykázal výrazně nižší citlivost pro detekci sulfadimidinu oproti BR-TESTU.

REPRODUKOVATELNOST DETEKCE

Reprodukovatelnost detekce dokumentují tab. III a IV. Vyplývá z nich, že u syrového i prezervovaného mléka je obdobná, přičemž INTEST vykazuje reprodukovatelnost detekce lepší.

VLIV PREZERVACE MLÉKA

Vliv prezervace mléka Heeschovým činidlem dokumentují tab. III a IV. Ze srovnání údajů obou uvedených tabulek vyplývá, že prezervace neovlivňuje detekci. Musíme však konstatovat, že u obou testů je třeba prodloužit dobu inkubace přibližně o jednu hodinu.

OVĚŘENÍ DOBY EXPIRACE

Vliv expirace testů dokumentují tab. III a IV. Z údajů tabulek je zřejmé, že oba testy jsou funkční po dobu deklarované expirace, tj. BR-TEST po dobu šesti týdnů, INTEST po dobu čtyř týdnů.

IV. Rozpětí detekčních limitů ($\mu\text{g/ml}$) v mléce s Heeschovým činidlem – The range of detection limits ($\mu\text{g/ml}$) in milk with Heesch's reagent

Testy ¹	Exspirace ²	Terapeutika ³					
		Penicilin ⁴	Streptomycin ⁵	Oxacilin ⁶	Chloramfenikol ⁷	Oxytetracyklin ⁸	Sulfadimidin ⁹
BR-test „AS“	DO	0,010 - 0,005	> 10,0	0,5 - 0,3	40,0 - 10,0	0,7	< 10,0
	PO	0,010	> 10,0	0,5	1000,0	0,7	< 10,0
BR-test 12x8 „AS“	DO	0,010 - 0,005	> 10,0	0,5	100,0 - 10,0	0,7	< 10,0
	PO	0,010	> 10,0	0,5	100,0	0,1	< 10,0
INTEST C 96	DO	0,005	> 10,0 - 1,0	0,3	10,0	0,7 - < 0,1	500,0
	PO	0,005	10,0	0,3	10,0	0,7	500,0
INTEST 0-96/6x16	DO	0,005	1,0	0,3	10,0	0,1	500,0
	PO	0,005	2,0	0,3	10,0	0,7	500,0

For 1 - 2 see Tab. III; for 3 - 9 see Tab. I

DISKUSE

Detekční limity námi zvolených chemoterapeutik pro redukční mikrotesty s brilliantovou černí (dále jen BRT), uváděné Mezinárodní mlékařskou federací (I D F, 1991) dokumentuje tab. V. Tato tabulka shrnuje i přípustná maxima reziduí chemoterapeutik v mléce podle požadavků Světové zdravotnické organizace (W H O, 1969) a Komise evropského společenství (E E C, 1992). Je z ní patrné, že detekční limity vybraných chemoterapeutik pro BRT překračují přípustná maxima reziduí kromě penicilinu.

Naše výsledky svědčí o tom, že detekční limit pro penicilin byl dosažen u INTESTU. BR-TEST v některých případech požadovaný detekční limit nesplnil. Z toho vyplývá, že v našich experimentech nebyly potvrzeny nízké detekční limity, které uvádí pro BR-TEST Schraudy a Rauscher (1972) a Sixl aj. (1990).

Podle našich výsledků pouze INTEST vykázal detekční limit pro streptomycin nižší než udává I D F (1991). Dosažené hodnoty 0,5 - 10 $\mu\text{g/ml}$ jsou v některých případech nižší, než uvádí Ebrecht (1985) a srovnatelné s údaji, které uvádějí Kraack a Tolle (1967), Schraudy a Rauscher (1972), Černá (1985) a Sixl aj. (1990). Oproti těmto literárním údajům byl v našich

V. Detekční limity a přípustná maxima reziduí chemoterapeutik v mléce – Detection limits and admissible maxima of chemotherapeutic residues in milk

Terapeutika ¹	Detekční limity ² (µg/ml) IDF (1991)	Přípustná maxima reziduí ³	
		WHO (1969) (µg/ml)	EEC (1992) (µg/g)
Penicilin ⁴	0,004	0,006	0,004
Streptomycin ⁵	13,000	0,200	-
Oxacilin ⁶	-	-	0,030
Chloramfenikol ⁷	15,000	0,000	0,010
Oxytetracyklin ⁸	0,500	0,100	0,100
Sulfadimidin ⁹	1,000	0,100	0,100

¹therapeutics, ²detection limits, ³admissible maxima of residues; for 4 - 9 see Tab. I

experimentech zjištěn při použití BR-TESTU vyšší detekční limit pro streptomycin. Přípustné maximum reziduí streptomycinu dle požadavků Světové zdravotnické organizace (W H O , 1969) 0,2 µg/ml je však až o dva řády nižší než námi zjištěný detekční limit BR-TESTU a v některých případech i INTESTU.

Detekční limity, ani přípustná maxima reziduí pro oxacilin, nejsou v citovaných materiálech IDF ani WHO uváděna. Podle požadavků EEC činí přípustné maximum 0,030 µg/g. Námi dosažený detekční limit 0,1 - 0,5 µg/ml u obou srovnávaných testů byl nižší než uvádějí S c h r a u d y a R a u s c h e r (1972). Přitom v některých případech byl INTEST oproti BR-TRESTRU citlivější. Nicméně zjištěný detekční limit překračuje o řád přípustné maximum podle požadavků EEC.

Chloramfenikol byl v našich pokusech INTESTEM detekován s citlivostí 10 µg/ml. Tento detekční limit je nižší než uvádí I D F (1991) a Č e r n á (1985), avšak vyšší než zaznamenali S c h r a u d y a R a u s c h e r (1972), E b r e c h t (1985), H a v l o v á a J i č í n s k á (1987) a S i x l a j. (1990). BR-TEST vykázal nižší citlivost ve většině případů v řádovém rozdílu. Přípustné maximum dle EEC 0,010 µg/g INTEST ani BR-TEST nemůže detekovat.

Detekční limit pro oxytetracyklin zaznamenaný v našich pokusech při použití INTESTU je téměř shodný s údajem I D F (1991) i autorů E b r e c h t (1985), H a v l o v á a J i č í n s k á (1987) a S i x l a j. (1990). BR-TEST vykázal citlivost v některých případech nižší. Přípustné maximum dle požadavků EEC splnil v našich pokusech INTEST i BR-TEST v ojedinělých případech.

Z našich experimentálních výsledků nelze posoudit, zda byl pro sulfadimidin dosažen deklarovaný detekční limit. Nicméně je třeba konstatovat, že INTEST je pro detekci sulfadimidinu nevhodný, neboť dosažený detekční limit 500,0 µg/ml mnohonásobně překračuje detekční limit deklarovaný IDF.

V naší experimentální práci jsme potvrdili údaje firemní literatury, že oba srovnávané testy je možno použít bez ovlivnění detekčních limitů i s mlékem prezervovaným Heeschénovým činidlem. Nezaznamenali jsme však značné prodloužení

redukční doby, neboť k ustálení výsledků reakce docházelo obvykle po jednohodinovém prodloužení inkubace.

Závěrem můžeme konstatovat, že podle našich experimentů INETST prokázal výsledky srovnatelné a v některých případech lepší než BR-TEST, s výjimkou průkazu sulfadimidinu. Vzhledem k tomu, že klinické použití sulfadimidinu u dojníc je málo frekventované, lze INETST doporučit k systematickému plošnému screeningu inhibičních látek antibiotické povahy. Nicméně BR-TEST ani INETST nevykazují citlivost, která by postačovala k průkazu přípustných maxim reziduí chemoterapeutik podle požadavků Světové zdravotnické organizace a Komise evropského společenství. To naznačuje nezbytnost a směr dalšího výzkumu.

Literatura

- ČERNÁ, E.: Zjišťování inhibičních látek v mléce v rámci mezinárodní normalizace. *Mlék. Listy*, 11, 1985, Praha, s. 79-82.
- EBRECHT, A.: Verbesserte Nachweis von Hemmstoffen in Milch. *Dtsch. Milchwirtschaft*, 14, 1985, s. 416.
- EEC: Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *O. J. Europ. Com.*, L 73, 1992, s. 8-14.
- HAVLOVÁ, J. - JIČÍNSKÁ, E.: Nové trendy v hodnocení inhibičních látek v mléce. *Veter. Péče v potrav. Prům.*, 8, 1987, s. 58-64.
- IDF: Detection and Confirmation of Inhibitors in Milk and Milk Products. *Doc. IDF* 258, 1991, 99 s.
- KRAACK, J. - TOLLE, A.: Brillantschwarz-Reduktionstest mit *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch. *Milchwissenschaft*, 11, 1967, s. 669-673.
- SCHRAUDY, E. - RAUSCHER, W.: Ein Beitrag zum Nachweis von Antibiotika in der Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest. *Arch. Lebensm.-Hyg.*, 6, 1972, s. 117-121.
- SIXL, W. - MIKULÁŠKOVÁ, M. - MIKULÁŠEK, S. - WATZEK, A. - SIXL-VOIGT, B.: Hygiene-Aspekte in der Rohmilchproduktion. Graz 1990, 49 s.
- WORLD HEALTH ORGANISATION: Technical report series No. 430. 1969, Ženeva.

Došlo 8. 10. 1992

RYŠÁNEK, D. - SCHLEGELOVÁ, J. (Veterinary Research Institute, Brno):

The efficiency of BR-TEST and INETST in determination of chemotherapeutic residues in raw and preserved milk.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (4): 215-222.

Negative detection of residues of inhibitory substances has become one of the standard quality traits of raw milk also in the Czech Republic. Hence a requirement appeared in 1991 to evaluate the usability of two commercially produced microtitration tests for this purpose.

The tests of BR-TEST (Enterotox) and INETST (Mlékárenský průmysl) were performed in weekly intervals for the time longer by a week than is the declared expiration, that means seven replications in BR-TEST and five replications in INETST. Compact and stripped microplates (STRIPS) designated BR-TEST "AS", BR-TEST 12x8 "AS" and INETST C-96 type and INETST 0-96/6x16 were used for the tests. The principle

of inhibition demonstration in the concentration series of selected drugs was applied. The drugs were chosen with respect to the frequency of their use for clinical treatments in the CR. Tab. II shows the used drugs and concentration series. The following parameters were tested: detection limits, reproducibility, effect of milk preservation, and the declared expiration.

Tab. III shows detection limits. It is apparent the BR-TEST detection responses to streptomycin and chloramphenicol were lower in BR-TEST than in INTEST in our experiments. The responses to penicillin, oxacillin and oxytetracycline were lower in some cases, and equal in other ones. On the other hand, the INTEST detection response to sulfadimidin was markedly lower in comparison with BR-TEST.

Tab. IV summarizes the range of detection limits in milk with Heeschen's reagent. In our experiments the detection response of BR-TEST to the tested chemotherapeutics was lower in some cases, in other cases it was the same as in INTEST. Similarly like in unpreserved milk, the detection response to sulfadimidin was markedly higher in INTEST if compared with BR-TEST.

Tabs. III and IV show the reproducibilities. It is apparent that INTEST is superior in this respect.

Tabs. III and IV show the effects of milk preservation. The preservation does not influence detection responses. But it is necessary to prolong the incubation time by about one hour.

Tabs. III and IV also show the check of the expiration time. Both tests were operative during their declared expiration.

On the basis of the above-mentioned results, INTEST can be recommended for systematic global screening of residues of inhibitory substances belonging to antibiotics. But none of the tests was sensitive enough to detect admissible residue concentrations.

milk; preserved milk; reduction test; residues of chemotherapeutics; detection limits; reproducibility; expiration

Contact Address:

MVDr. Dušan R y š á n e k, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70,
621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 741121, fax 05 752240

DNA FINGERPRINTING U KONÍ

J. Pazdera¹, V. Hruban², J. Pichrtová³, Z. Müller⁴, F. Jílek¹

¹ *Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha-Uhřetěves*

² *Vysoká škola zemědělská, Praha-Suchbát*

³ *Ústav pro péči o matku a dítě, Praha*

⁴ *Výzkumná stanice pro chov koní, Slatiňany*

Za použití multilokusové DNA sondy byly u šesti rodin koní určeny metodou DNA fingerprinting individuálně specifické vzory DNA fragmentů. Sonda s evolučně konzervovanou nukleotidovou sekvencí z bakteriofágu M13 určuje hypervariabilní oblasti nacházející se v genomové minisatelitní DNA. Použití této sondy umožňuje identifikaci jedince a provedení kontroly původu s pravděpodobností vyšší jak 99,99 %.

kůň; DNA fingerprinting; kontrola paternity

Genom obratlovců je tvořen sledem asi 3 miliard párů bází (thymín, adenin, cytosin a guanin), přičemž geny řídící určitý bílkovinný produkt tvoří jen jeho malou část. Ve zbytku genomu, o jehož funkci víme jen velmi málo, tvoří značnou část různě dlouhé opakující se sekvence nukleotidů. Tato část genomu, nazývaná též repetitivní DNA, může být tvořena od jednoduchého mnohočetného opakování stále stejného nukleotidu až po mnohonásobně se opakující složité nukleotidové struktury. Pro repetitivní DNA tvořenou několika málo opakujícími se sekvencemi nukleotidů je používán termín mikrosatelitní DNA, pro opakující se sekvence deseti až několika desítek nukleotidů se vžil termín minisatelitní DNA (Jeffreys aj., 1985). Pro řadu lokusů situovaných do minisatelitní DNA je charakteristický vysoký stupeň polymorfismu (Vassart aj., 1987). K detekci alelické variability lze využít komplementární vazby. Jako sondy je možno použít sekvence vyskytující se v nezměněné formě (i když v různém počtu opakování) v řadě organismů. Příkladem takového evolučně konzervovaného úseku DNA je sekvence vyskytující se jak v genomu bakteriofágu M13 tak v genomu drosophily i člověka. Výskyt takových sekvencí v genomu koní prokázal Georges aj., (1988). Použití zmíněné sekvence nukleotidů, charakteristické pro minisatelitní DNA jako sondy, umožňuje současně detekovat několik hypervariabilních oblastí rozložených na různých místech genomu testovaného zvířete. Po štěpení restriktčním enzymem lze dostat zcela specifické, různě dlouhé fragmenty (v místě, kde došlo k vazbě se sondou se objeví signál na rentgenologickém filmu, proužkování), fingerprinty. Jednotlivé fingerprinty představují alely detekovaných lokusů a jsou mendelovsky děděny. Lokusy mají až 20 alel avšak jejich mutace jsou zjišťovány poměrně řídko (Jeffreys aj., 1988). Vysoký polymorfismus detekovaných lokusů a kodominantní dědičnost jejich alel umožňuje vyšší stupeň identifikace jedince než zajišťují

klasické sérologické metody založené na detekci krevních skupin, sérových proteinů nebo na detekci alel hlavního histokompatibilního komplexu. Pravděpodobnost výskytu společných paternitních vzorů je extrémně malá (Risch a Devlin, 1992). Tato pravděpodobnost je některými autory odhadována až v hodnotách kolem 1 : 30 biliónům (Lewis a Cruse, 1992). Poněvadž metoda je požívána v kriminalistice a její rozlišovací přesnost je srovnatelná snad je s daktyloskopickou metodou, je metoda označována termínem DNA fingerprinting.

MATERIÁL A METODY

Výsledky byly získány vyšetřením šesti rodin (18 zvířat) koní plemene kladubský vraník z chovu Výzkumné stanice pro chov koní. Slatiňany.

DNA byla izolována z lymfocytů periferní krve odebrané do EDTA (Jeanpierre, 1987). Vyšetření bylo provedeno technikou southern blotů podle Maniatis *et al.* (1982): Vždy 5 µg DNA bylo štěpeno (4 j/µg) restričním enzymem Hinf I (Fermentas). Po elektroforetické separaci v 0,7% agarosovém gelu (2V/cm, 16 h) byla DNA přetisknuta na nylonovou membránu (NY 45, Serva). Prehybridizace probíhala při teplotě 58 °C v roztoku (7% natrium-dodecyl sulfát, 0,5 M NaH₂PO₄, pH 6,5, 1% sérumalbumin BSA - frakce V, Serva) po dobu 1 hodiny. Hybridizační roztok neobsahoval BSA. Hybridizace sondy radioaktivně značené fosforem probíhala při teplotě 58 °C po dobu 18 hodin. Jako sonda byl použit Hae III fragment (850 párů bází) překlonovalý z bakteriofágu M13 (Devor, 1988) do plazmidu pUC 18. Tento fragment nesoucí čtyřikrát opakované centrální sekvence byl radioaktivně označen za použití deoxyadenosin trifosfátu (NEG 012H, NEN) metodou využívající náhodných hexanukleotidových primerů „random primer labeling“ (Flinberg a Vogelstein, 1983). Po odmytí nespecificky navázané sondy byly membrány autoradiografovány v kazetách na rentgenologický film bez použití zesilovacích fólií při pokojové teplotě po dobu 5 dnů. Velikost fragmentů byla stanovena pomocí DNA markeru Sevac I (Sevak, Praha).

VÝSLEDKY

Celkem bylo vyšetřeno šest tříčlenných rodin koní. Od každého zvířete bylo odebráno 7 ml periferní krve a z ní izolováno 50 - 150 µg DNA. Po rozštěpení DNA enzymem Hinf I byly sledovány značenou sondou hypervariabilní fragmenty. Velikost prakticky hodnotitelných fragmentů byla stanovena mezi 3,5 - 21 kilobází. Pro statistické šetření byl u každé rodiny hodnocen celkový počet fragmentů zděděných potomkem od matky a od otce (tab. I). Pro případ nonpaternity, mutace ev. rekombinace byl sledován případný výskyt fragmentů, které se u matky ani u otce nevyskytují. Takový případ však nenastal. Na autoradiogramech rodin bylo v průměru detekováno 11,33 fragmentů. Z nich bylo možno přiřadit 9,17 jen jednomu z rodičů a 2,17 oběma rodičům. Sřední pravděpodobnosti výskytu shodných fragmentů, tedy fragmentů nevyužitelných pro ověřování původu, je $2,17 : 11,3 = 0,19$. V jednotlivých rodinách bylo možno u hříbat detekovat 3 - 6 fragmentů specifických pro otce. Pravděpodobnost, že by nepříbuzný jedinec měl všechny detekované fragmenty

I. Vyhodnocení autoradiografií získaných „fingerprintů“ - Evaluation of autoradiographs of „fingerprints“ obtained

Číslo rodiny ¹	Počet fragmentů ²					Pravděpodobnost chybného určení původu ze strany otce ⁹
	specifických ³		společných ⁶	nerodičovských ⁷	celkem ⁸	
	pro otce ⁴	pro matku ⁵				
1	6	4	3	0	13	0,00005
2	6	7	3	0	16	0,00005
3	6	3	1	0	10	0,00005
4	5	4	2	0	11	0,0003
5	3	4	2	0	9	0,007
6	4	3	2	0	9	0,001

¹ number of family, ² number of fragments, ³ specific, ⁴ for father, ⁵ for mother, ⁶ common, ⁷ non-paternal, ⁸ total, ⁹ probability of wrong determination of origin from the side of father

společné s testovaným hříbětem lze odhadnout na 0,007 - 0,00005. Uvedená hodnota vyjadřuje míru rizika nesprávného určení původu.

DISKUSE

Statistické hodnocení je založeno na předpokladu, že výskyt každého z fragmentů je stejně pravděpodobný. Není tedy zvažována existence možné vazby apod. I když je známo, že hodnocení delších fragmentů má vyšší diagnostickou hodnotu, nebere námi zvolený způsob v úvahu velikost posuzovaných fragmentů. Zjednodušení dovolují výsledky jiných autorů publikované pro jiné multilokusové sondy (sonda označená číslem 33,6 a sonda 33,15) - Jeffreys aj., (1985, 1991). Jedná se např. o zjištění obdobného výskytu shodných fragmentů v rodinách. V našem případě jsme volili stejný matematický přístup k hodnocení pravděpodobnosti jako použili při stanovení paternity analýzou DNA z choriových klků u lidí Mosinger a Jirásek (1990). Možným chybám reproducibility testu DNA fingerprinting je v poslední době věnována značná pozornost (Lewontin a Hartl, 1991; Chakraborty a Kidd, 1991; Jeffreys aj., 1991; Risch a Devlin, 1992). Důvodem je skutečnost, že metoda je v kriminalistice používána jako metoda průkazná (na rozdíl od vylučovacích metod založených na detekci krevních skupin). Zpochybnění reproducibility testu se obvykle týká míst daleko za desetinnou čárkou. Pro námi zvažované praktické použití je rozhodující skutečnost, že v případě potřeby přesnějšího potvrzení nebo vyloučení paternity stačí při testu rozšířit počet použitých restričních enzymů (eventuálně sond), čímž pravděpodobnost možného omylu klesá o několik dalších řádů. Porovnání klasického paternitního testu za použití testace krevních skupin a antigenů

hlavního histokompatibilitního komplexu s DNA fingerprintingem, při kterém byly použity jen dvě multilokusové sondy, zcela zřetelně vyznělo ve prospěch DNA testace (M a r k o w i c z aj., 1990). Závažnějším problémem pro plošnou aplikaci metody může být snad jen vyšší cena vyšetření.

Při vyhodnocování výsledku testu je třeba mít na mysli, že pokud se ve fingerprintu potomka objeví fragmenty, které se nevyskytují u rodičů, nemusí to být vždy známky nepravděpodobného původu. Vzácně by se mohlo jednat o mutaci ve sledované oblasti nebo také jenom o nedostatečné rozštěpení testované DNA restriktčním enzymem. K tomu může dojít při nedodržení metodiky nebo ztrátou aktivity enzymu vlivem dlouhého nebo nešetrného skladování. Kontrola k vyloučení této chyby je snadná. Fingerprint parciálních štěpů není při opakování nikdy shodný.

Použití multilokusových sond našlo své opodstatnění v oblasti průkazu paternity u lidí. Má některé přednosti, mezi něž patří poměrně snadná dostupnost sond. Námi zvolený přístup má však některé nevýhody. Nevýhodou pro některé laboratoře může být použití izotopu. Výsledek testu je znám až za poměrně dlouhou dobu, což je dáno expoziční dobou filmu při autoradiaografii. Značné sondy lze provést též neradioaktivními způsoby, např. digoxigeninem, je to však obvykle na úkor ostrosti získaných fingerprintů.

Poslední práce z oblasti genetického polymorfismu u koní studovaného na úrovni DNA naznačují, že pro potřeby ověření paternity lze vedle minisatelitních lokusů s úspěchem využít též mikrosatelitní lokusy (E l l e g r e n aj., 1992). Výhodou tohoto způsobu je možnost užití automatizace při aplikaci techniky polymerázové řetězové reakce. K detekci mikrosatelitních opakujících se sekvencí není třeba izotopů. Podmínkou však je znalost sekvence sledované oblasti DNA a syntéza primerů - specifických sekvencí pro počátek a konec testovaného polymorfního lokusu. Rovněž u této metody je předpokládáno brzké uplatnění v provádění kontroly paternity u koní (D o d d aj., 1992).

Přímá DNA testace, ať již za použití multilokusových nebo jednolokusových sond (resp. užití Southern blotting techniky nebo techniky polymerázové řetězové reakce), skýtá vysoce přesný způsob identifikace jedince, který začíná nacházet praktické uplatnění v chovu hospodářských zvířat.

P o d ě k o v á n í

Autoři děkují paní Věře S k o j o v é z Ústavu pro péči o matku a dítě, Praha za obětavou pomoc v laboratoři a MUDr. Bedřichu M o s i n g e r o v i, CSc, rovněž z ÚPMD, Praha za poskytnutí bakterií k přípravě sondy.

Literatura

- DEVOR, E. J.: A rapid method for confirming cell line identity: DNA fingerprinting with minisatellite probe from M13 bacteriophage. *Biotechnique*, 6, 1988, s. 200-202.
- DODD, J. - SPENCER, M. - MORRIS, B. G.: Toward a practical PCR - based DNA test for identification and parentage verification in cattle and horses. In: XXIII. Int. Conf. on Anim. Genet., Interlaken, 1992, s. 64.
- ELLEGREN, H. - JOHANSSON, M. - SANDBERG, K. - ANDERSSON, L.: Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim. Genet.*, 23, 1992, s. 133-142.
- FLINBERG, A. P. - VOGELSTEIN, B.: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Ann. Biochem.*, 132, 1983, s. 6-13.
- GEORGES, M. - LEWUARRE, A. S. - CASTELLI, M. - HANSET, R. - VASSART, G.: DNA fingerprinting in domestic animals using different minisatellite probes. *Cytogenet. and Cell Genet.*, 47, 1988, s. 127-131.
- CHAKRABORTY, R. - KIDD, K. K.: The utility of DNA typing in forensic work. *Science*, 254, 1991, s. 1745-1750.
- JEANPIERE, M.: A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucl. Acid. Res.*, 15, 1987, s. 9611.
- JEFFREYS, A. J. - MACLEOD, A. - TAMAKI, K. - NEIL, D. L. - MONKTON, D. G.: Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*, 354, 1991, s. 204-209.
- JEFFREYS, A. J. - ROYLE, N. J. - WILSON, V. - WONG, Z.: Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature*, 332 1988, s. 278-281.
- JEFFREYS, A. J. - TURNER, M. - DEBENHAM, P.: The efficiency of multilocus DNA fingerprint probes for individualization and establishment of family relationships, determined from extensive casework. *Amer. J. hum. Genet.*, 48, 1991, s. 824-840.
- JEFFREYS, A. J. - WILLSON, V. - THEIN, S. L.: Individual - specific fingerprints of human DNA. *Nature*, 317, 1985, s. 76-79.
- LEWIS, R. E. - CRUSE, J. M.: DNA typing in human parentage testing using multilocus and single-locus probes. In: MARTIN, R. D. (ed.): *Paternity in Primates*. Karger, 1992.
- LEWONTIN, R. C. - HARTL, D. L.: Population genetics in forensic DNA typing. *Science*, 254, 1991, s. 1754-1750.
- MANIATIS, T. - FRITSCH, E. P. - SAMBROOK, J.: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- MARKOWICT, K. R. - TONELLI, L. A. - ANDERSON, M. B. - GREEN, D. J. - HERRIN, G. L. - COTTON, R. W. - GOTTSCHILL, J. L. - GARNER, D. D.: Use of deoxyribonucleic acid (DNA) fingerprints for identity determination: Comparison with traditional paternity testing methods. Part II. *J. Forensic Sci.*, 35, 1990, s. 1270-1276.
- MOSINGER, B. - JIRÁSEK, J. E.: Určení paternity analýzou DNA z choriových klků. *Čas. Lék. čes.*, 129, 1990, s. 400-402.
- RISCH, N. J. - DEVLIN, B.: On the probability of matching DNA fingerprints. *Science*, 255, 1992, s. 717-720.
- VASSART, G. - GEORGES, M. - MONSIEUR, E. A.: A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science*, 235, s. 683-684.

Došlo 26. 11. 1992

PAZDERA, J. - HRUBAN, V. - PICHRTOVÁ, J. - MÜLLER, Z. - JÍLEK, F. (Research Institute of Animal Production, Praha-Uhřetěves; University of Agriculture, Praha; Institute for Care of Mother and Child, Praha; Research Station for Horse Breeding, Slatiňany):

DNA fingerprinting in horses.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (4): 223-228.

Using a multilocus DNA probe, individual - specific hybridization patterns, the so-called DNA fingerprints (TAB) were determined in six horse families by the DNA fingerprinting method. The probe with evolutionally preserved nucleotide sequence from bacteriophage M13 determines hypervariable regions placed in genomic minisatellite DNA. The use of this probe permits an identification of an individual and execution of paternity relationships with a probability over 99.99 per cent.

horse; DNA fingerprinting; paternity control

Contact Address:

Ing. Josef Pazdera CSc., Výzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815,
104 00 Praha-Uhřetěves, Czech Republic
Tel. 02 750221, fax 02 750690

VPLYV KADMIA NA UKAZOVATELE BACHOROVEJ FERMENTÁCIE A JEHO OBSAH V BIOLOGICKOM MATERIÁLI OVIEC

P. Sviatko, I. Zelenák

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

Pokus sa uskutočnil na troch skupinách dospelých oviec. Prvá skupina (kontrolná) mala prívod 0,09 mg Cd/kg sušiny diéty, I. pokusnej skupine bol zvýšený prívod o 5 mg/kg sušiny a II. pokusnej skupine o 10 mg/kg sušiny diéty. Počas siedmich týždňov sme sledovali vplyv týchto dávok kadmia na hladiny unikavých mastných kyselín, ich energetickú výťažnosť a podiel ich energie a energie metánu i energie bakteriálnej masy z energie fermentovanej hexózy krmiva, ako aj celkový počet infuzórií a počet infuzórií *Entodinium* speciés v bachorovej šľave oviec. Okrem toho bol sledovaný obsah kadmia v pečeni, obličkách, svalovine, truse a bachorovej šľave. Z výsledkov vyplýva, že prívod kadmia v množstve 5 a 10 mg/kg sušiny v diéte oviec mal preukazne negatívny vplyv na produkciu kyseliny izomaslovej v bachorovej šľave a na zníženie celkového počtu infuzórií a počtu infuzórií *Entodinium* speciés v bachorovej šľave oviec. Preukazný vplyv tohoto prívodu kadmia na produkciu ostatných unikavých mastných kyselín a energetické ukazovatele bachorovej fermentácie zistený nebol. Uvedené množstvá kadmia v diéte preukazne vplývali na zvyšovanie jeho obsahu v obličkách, pečeni, bachorovej šľave a truse. Na obsah vo vlne a svalovine prídavky kadmia nemali preukazný vplyv.

ovca; obsah kadmia; ukazovatele bachorovej fermentácie; počet infuzórií; orgány

Kadmium patrí medzi esenciálne mikroelementy. Pri karenčnom prívode u prežúvavcov bola zistená znížená koncepcia a produkcia mlieka, u mláďat retardácia rastu, svalová slabosť, znížená motilita a úhyn. Zvýšením prívodu na 0,3 mg Cd v kg sušiny diéty boli tieto príznaky eliminované (A n k e a i., 1986). Rovnakí autori uvádzajú, že vyšší prívod než 0,05 mg Cd/kg sušiny diéty zaručuje normálny vývoj zvierat. V prípade kadmia je karencia možná, no väčší význam má jeho negatívny vplyv pri vyššom prívode do organizmu. Kadmium ľahko reaguje s radou aktívnych molekúl proteínov, fosfolipidov, purínov, porfyrínov, nukleových kyselín a enzýmov, pričom mení ich aktivitu, čo je podstatou jeho toxického účinku (C i b u l k a a i., 1986). V obličkách spôsobuje tubulárnu atrofiu a intersticiálnu fibrózu (L e n n e r, 1969). V tkanivách je kadmium viazané na metalothionein a pri intoxikácii sa jeho obsah zvyšuje v pečeni a obličkách, ktoré tento metalothionein produkujú (S h a r m a a i., 1979). O toxickom vplyve kadmia rozhoduje jeho prívod do organizmu, čo je spoločným rysom všetkých mikroelementov. S h a r m a a i. (1979) pri prívode 13,06 mg Cd v 1 kg diéty u kráv nezistili jeho kumuláciu. D o y l e a i. (1974) zistili preukazne negatívny vplyv 30 mg Cd/kg sušiny diéty

na prírastky hmotnosti u oviec a pri dóze 15 mg/kg sušiny depresívny vplyv na príjem krmiva. Bolo zistené, že zvýšenie koncentrácie Cd malo výrazný inhibičný vplyv na rast a aktivitu pôdnych baktérií (G u p t a i., 1984). Uvedené poznatky nás viedli k otázke aký vplyv majú nižšie dávky kadmia 5,0 a 10,0 mg/kg sušiny diéty na tkanivá a niektoré ukazatele bachorovej fermentácie.

MATERIÁL A METÓDY

V pokuse bolo použitých 18 dospelých oviec plemena merino o živej hmotnosti 40 - 45 kg. Zvieratá boli krmené diétou pozostávajúcou z 1 kg lúčneho sena a 0,2 kg jačmenného šrotu. Po troch týždňoch krmenia sa odobrali od všetkých zvierat vzorky vlny, trusu a bachorovej šťavy na stanovenie obsahu kadmia (kontrolné hodnoty). Šesť zvierat sa odporazilo na stanovenie obsahu kadmia v pečeni, obličkách a svalovine. Zbývajúce zvieratá sa rozdelili po šiestich kusov do dvoch skupín. I. pokusná skupina dostávala prídavok 5 mg Cd a II. pokusná skupina 10 mg Cd/kg sušiny na kus a deň po dobu siedmich týždňov. Prídavky kadmia vo forme síranu boli zamiešané do šrotu. Na konci pokusu boli ovce odporazené za účelom získania rovnakých orgánov ako u kontrolných zvierat na stanovenie obsahu kadmia. Obsah kadmia v základnej krmnej dávke (sena a jačmeň) bol 0,09 mg/kg sušiny.

Obsah Cd bol stanovený na AAS fotometri Perkin - Elmer 5000 v grafitovej kytete HGA 500.

Koncentrácia unikavých mastných kyselín (UMK) v bachorovej šťave bola stanovená na plynovom chromatografe Perkin - Elmer 8500.

Počet infuzórií sa stanovil podľa metódy C o l e m a n a (1958). Energetická výťažnosť UMK bola stanovená metódou autorov O r s k o v (1968) a C z e r k a w s k i (1986).

VÝSLEDKY

Výsledky obsahu UMK v bachorovej šťave sú uvedené v tab. I. Obsah kyseliny octovej na konci pokusu je nepatrne vyšší u skupín s prídavkom 5 mg Cd (I. skupina) a s prídavkom 10 mg Cd/kg sušiny diéty (II. skupina), no rozdiel nie je štatisticky preukazný. Rovnaká tendencia je i pri obsahu kyseliny propiónovej s tým rozdielom, že jej obsah v II. skupine je nižší než na začiatku pokusu. Pri obsahu kyseliny izomaslovej v porovnaní so začiatkom pokusu v oboch skupinách s prídavkom Cd došlo k jej preukaznému poklesu ($\alpha = 0,05$). Obsah kyseliny n-maslovej sa mierne zvýšil v oboch skupinách, no tento nárast je nepreukazný. Produkcia kyseliny izovalérovej sa mierne, ale nepreukazne, znížila a obsah kyseliny n-valérovej zostal počas pokusu nezmenený. Celkové množstvo UMK v bachorovej šťave sa miera, no nepreukazne zvýšilo. Tendencia zvýšenia bola v I. skupine nepatrne vyššia než v II. skupine.

Výsledky energetickej výťažnosti UMK a podiel ich energie a energie metánu a bakteriálnej masy z fermentovanej hexózy krmiva podľa O r s k o v a (1968) a C z e r k a w s k é h o (1986) sú uvedené v tab. II. Energetická využiteľnosť UMK (E) (O r s k o v , 1968) a podiel energie UMK z energie fermentovanej hexózy (E1) (C z e r k a w s k i , 1980) majú tendenciu poklesu v oboch skupinách s prídavkom

I. Obsah unikavých mastných kyselín (UMK) v bachorovej šťave oviec (mmol/l) - Contents of volatile fatty acids (UMK) in rumen fluid of sheep (mmol/l)

		Kontrolná skupina ¹	I. pokusná skupina ²	II. pokusná skupina ³
Prídavok Cd ⁴		0	5 mg/kg sušiny ⁵	10 mg/kg sušiny ⁶
ÚMK	n	x 95% IS	x 95% IS	x 95% IS
Kyselina octová ⁷	6	33,9 30,3 - 37,5	38,0 32,5 - 43,3	36,8 24,5 - 49,0
Kyselina propiónová ⁸	6	8,03 6,35 - 9,70	8,35 6,61 - 10,09	7,55 5,11 - 9,98
Kyselina izo-maslová ⁹	6	0,50 * # 0,37 - 0,53	0,30 * 0,18 - 0,40	0,40 # 0,31 - 0,46
Kyselina n-maslová ¹⁰	6	5,13 4,04 - 6,22	6,03 5,33 - 6,73	5,78 3,72 - 7,85
Kyselina izo-valerová ¹¹	6	0,50 0,36 - 0,68	0,30 0,13 - 0,50	0,40 0,27 - 0,50
Kyselina n-valerová ¹²	6	0,30 0,20 - 0,39	0,30 0,20 - 0,39	0,30 0,19 - 0,30
Celkove ÚMK ¹³	6	48,30 42,7 - 54,0	53,20 45,8 - 60,6	51,20 34,7 - 67,6

* # = štatisticky významný rozdiel na úrovni $\alpha = 0,05$ - statistical significant difference on the level $\alpha = 0,05$

¹control group, ²experimental group I, ³experimental group II, ⁴Cd addition, ⁵5 mg/kg of dry matter, ⁶10 mg/kg of dry matter, ⁷acetic acid, ⁸propionic acid, ⁹isobutyric acid, ¹⁰n-butyric acid, ¹¹isovaleric acid, ¹²n-valeric acid, ¹³total volatile fatty acids

Vysvetlivky pre tab. I a IV - Explanation for Tabs. I and IV:

x = stredná hodnota - mean value

95% IS = interval spoľahlivosti strednej hodnoty - interval of reliability of mean value

* # @ = štatistická preukaznosť na úrovni $\alpha = 0,05$ - statistical significance on the level $\alpha = 0,05$

Cd, no rozdiel oproti počiatočným hodnotám nie je štatisticky preukazný. Rovnaká situácia je aj pri podiele energie bakteriálnej masy (E3) z energie fermentovanej hexózy krmiva. Pri podiele energie metánu (E2) z energie fermentovanej hexózy krmiva tento má tendenciu nárastu u oboch skupín s prídavkom Cd, ale rozdiel oproti počiatočným hodnotám nie je štatisticky preukazný.

Výsledky vplyvu prídavkov Cd na celkový počet infuzórií a infuzórií *Entodinium* speciés (tab. III) sa v oboch skupinách s prídavkom Cd preukazne ($\alpha = 0,05$) znížil v porovnaní s hodnotami na začiatku pokusu.

II. Energetické ukazovatele bachorovej fermentácie - Energetic parameters of rumen fermentation

	Kontrolná skupina ¹	I. pokusná skupina ²	II. pokusná skupina ³
Prídavok Cd ⁴	0	5 mg/kg sušiny ⁵	10 mg/kg sušiny ⁶
%	x ± sem		
E	72,50 ± 0,287	72,17 ± 0,277	71,84 ± 0,157
E1	72,46 ± 0,303	72,20 ± 0,291	71,85 ± 0,157
E2	17,94 ± 0,295	18,23 ± 0,291	18,58 ± 0,163
E3	37,49 ± 0,212	37,21 ± 0,082	37,20 ± 0,200

E = energetická výťažnosť UMK (O r s k o v , 1968) - energetic efficiency of volatile fatty acids (O r s k o v , 1968)

E1 = podiel energie UMK z energie fermentovanej hexózy krmiva (C z e r k a w s k i , 1980) - proportion of energy of volatile fatty acids from energy of fermented hexose of feeds (C z e r k a w s k i , 1980)

E2 = podiel energie metánu z energie fermentovanej hexózy krmiva (C z e r k a w s k i , 1980) - proportion of methane from energy of fermented hexose of feeds (C z e r k a w s k i , 1980)

E3 = podiel energie bakteriálnej masy z energie fermentovanej hexózy krmiva (C z e r k a w s k i , 1980) - proportion of energy of bacterial mass from energy of fermented hexose of feeds (C z e r k a w s k i , 1980)

For 1 - 6 see Tab. I

III. Počet infuzórií v bachorovej šľave oviec - Counts of infusoria in rumen fluids of sheep

	Kontrolná skupina ¹	I. pokusná skupina ²	II. pokusná skupina ³
Prídavok Cd ⁴	0	5 mg/kg sušiny ⁵	10 mg/kg sušiny ⁶
10 ⁶ /l	x 95% IS		
Celkový počet infuzórií ⁷	384,0 *	246,0 *	305,0
	331,1 - 436,9	186,2 - 305,8	223,4 - 386,6
Počet infuzórií <i>Entodinium</i> ⁸	359,0 # @	198,0 #	262,0 @
	307,3 - 410,7	153,2 - 242,8	188,4 - 335,6

For 1 - 6 see Tab. I, ⁷⁸

Výsledky obsahu kadmia v sledovaných tkanivách sú uvedené v tab. IV. Obsah Cd vo vlne pokusných skupín s prídavkom Cd v porovnaní s obsahom u zvierat na začiatku pokusu je vyšší, no rozdiel nie je štatisticky preukazný.

Obsah Cd v truse a v bachorovej šľave je v oboch skupinách na konci pokusu preukazne ($\alpha = 0,05$) vyšší než na začiatku pokusu. Pri porovnaní obsahu Cd truse pokusných skupín, obsah Cd v truse II. skupiny je preukazne ($\alpha = 0,05$) vyšší než v I. skupine.

V pečeni sa obsah Cd zvýšil u I. skupiny 2,5 násobne, no tento rozdiel oproti hodnotám na začiatku pokusu štatisticky preukazný nie je. U II. skupiny, kde nárast

IV. Obsah kadmia v biologických materiáloch oviec (mg/kg sušiny) - Cadmium contents in biological materials in sheep (mg/kg of dry matter)

		Kontrolná skupina ¹		I. pokusná skupina ²		II. pokusná skupina ³	
Prídavok Cd ⁴		0		5 mg/kg sušiny ⁵		10 mg/kg sušiny ⁶	
Tkanivo ⁷	n	x	95% IS	x	95% IS	x	95% IS
Vlna ⁸	6	0,160		0,224		0,299	
		0,117 - 0,202		0,143 - 0,306		0,173 - 0,424	
Trus ⁹	6	3,00 * #		20,30 * @		42,40 # @	
		1,20 - 4,80		15,30 - 25,30		27,60 - 57,20	
Bachorová šťava ¹⁰ (mg/l)	6	0,020 * #		0,150 *		0,270 #	
		0,017 - 0,023		0,040 - 0,270		0,160 - 0,390	
Pečeň ¹¹	6	0,90 *		2,30		2,80 *	
		0,00 - 1,80		0,90 - 3,70		1,91 - 3,60	
Oblička ¹²	6	1,00 * #		4,30 *		5,50 #	
		0,50 - 1,50		3,10 - 5,60		3,60 - 7,40	
Sval ¹³	6	0,140		0,230		0,240	
		0,060 - 0,220		0,140 - 0,310		0,100 - 0,380	

For 1 - 6 see tab. I; ⁷tissue, ⁸wool, ⁹excrements, ¹⁰rumen fluid, ¹¹liver, ¹²kidney, ¹³muscle

obsahu v pečeni je trojnásobný oproti počiatočným hodnotám, rozdiel je štatisticky preukazný ($\alpha = 0,05$).

Vo svalovine sa obsah Cd počas pokusného obdobia zvýšil zhruba o polovicu, no rozdiel oproti počiatočným hodnotám nie je preukazný.

DISKUSIA

Preukazné zníženie celkového počtu infuzórií a infuzórií *Entodinium* sp. je jednoznačne potvrdzujú negatívny vplyv i nižších dávok Cd ako je 5 a 10 mg/kg sušiny diéty. Úbytkom počtu infuzórií je vysvetliteľný i preukazný pokles produkcie kyseliny izomaslovej. Podobne tendencia znižovania energetických parametrov bachorovej fermentácie naznačujú možný negatívny vplyv použitých prídavkov Cd na tieto procesy. Uvedené je v súlade s údajmi F o s b e r g a (1978), ktorý zistil pri obsahu 5 - 70 mg Cd/l *in vitro* inhibičný efekt na rast čistej kultúry *Bacterium succinogenes* a pri obsahu 100 - 500 mg/l zníženie fermentačnej aktivity.

Obsah Cd v pečeni, obličkách a svalovine oviec na začiatku pokusu predstavuje bežný obsah a sú nižšie v porovnaní s hodnotami (po prepočte na sušinu), ktoré uvádza K r e u z e r a i. (1974) a K a č m á r a i. (1980) u dojnic a u oviec D o y l e a i. (1974). Z uvedeného vyplýva, že ovce vzaté do pokusu z hľadiska zaťaženia Cd boli intaktné.

Výsledky obsahu Cd v pečeni, obličke i bacherovej šľave vykázali preukazný nárast jeho obsahu vplyvom prídavku Cd v diéte. Možno to považovať za prejav kumulácie Cd v týchto materiáloch už pri dávkach 5 a 10 mg/kg sušiny diéty na rozdiel od údajov autorov S h a r m a a i. (1979), ktorí pri dávke 13,06 mg Cd/kg diéty u hovädzieho dobytku nezistili jeho kumuláciu.

Obsah kadmia v srsti a vlne považujú A n k e a R i s c h (1979) za tretí najaktívnejší materiál po obličke a pečeni v schopnosti odpovedať zmenou svojho obsahu na zaťaženie organizmu prežívavcov kadmium. Výsledky obsahu Cd vo vlne našich pokusných oviec na konci pokusu, sa zhodujú s údajmi týchto autorov o obsahu vo vlne oviec zaťažených Cd. Patrne pre preukazné zvýšenie obsahu Cd vo vlne sú potrebné vyššie dávky Cd v diéte, než sme použili. D o y l e a i. (1974) pri diéte s obsahom od 5 - 60 mg Cd/kg diéty rovnako nezaznamenal jeho preukazné zvýšenie vo vlne oviec.

Obsah Cd v truse pokusných skupín proporcionálne zodpovedá jeho prívodu diétou. Obsah Cd v truse I. skupiny v porovnaní s počiatočným obsahom sa zvýšil zhruba sedem násobne a v II. skupine 14 násobne. Z uvedených výsledkov je možné vyvodiť, že pri normálnom prívide Cd diétou sa jeho obsah v truse pohybuje do 5 mg/kg sušiny. Zistenie vyššieho obsahu v truse ako 5 - 10 mg Cd/kg sušiny nasvedčuje na zvýšený prívod Cd do organizmu. Podobne preukazné zvýšenie obsahu Cd v bacherovej šľave môže byť indikátorom prívodu Cd do organizmu ako trus.

Výsledky obsahu Cd vo svalovine mali tendenciu sa zvyšovať, no zistené obsahy u pokusných skupín na konci pokusu sú nižšie alebo zhodné než údaje autorov K a ě m á r a i. (1980) a K r e u z e r a i. (1974) vo svalovine u dojnic nezaťažených Cd. Podobne D a l g a r n o (1980) pri diétach oviec s obsahom 3,4 a 6,4 mg Cd/kg nezistil jeho preukazné zvýšenie vo svalovine, zatiaľ čo v pečeni a obličke preukazné zvýšenie zaznamenal.

Literatúra

- ANKE, M. - RISCH, M.: Haaranalyse und Spurenelementstatus. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag 1979, 263 s.
- ANKE, M. - GROPP, B. - SCHMIDT, A. - KRONEMAN, H.: Cadmium deficiency in ruminants. In: Sbor. Ref. Symp., Karl-Marx Univ., Leipzig und Fr.Sch. Univ., Jena, 1986, s. 937-946.
- CIBULKA, J. - MADER, P. - SOVA, Z.: Pohyb olova, kadmia a rtuti v zemědělské výrobě a biosféře. Praha, SZN 1986, 160 s.
- COLEMAN, G. S.: Maintenance of oligotrich protozoa from the sheep rumen in vitro. *Nature*, 182, 1958, s. 1104-1105.
- CZERKAWSKI, J. W.: Introduction to rumen studies. Oxford, Pergamon 1980.
- DALGARNO, A. C.: The effect of low level exposure to dietary cadmium, on cadmium, zinc, copper and iron contents of selected tissues of growing lambs. *J. Sci. Food Agric.*, 31, 1980, s. 1043-1049.
- DOYLE, J. J. - PFANDER, W. H. - GREBING, S. E. - PIERCE, J. O.: Effects of dietary cadmium on growth, cadmium absorption and cadmium tissue levels in growing lambs. *J. Nutr.*, 104, 1974, 160 s.
- FOSBERG, C. W.: Effect of heavy metals and other trace elements on the fermentative activity of the rumen microflora and growth of functionally important bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 24, 1978, s. 298-306.
- GUPTA, S. K.: Importance of soil solution composition in deciding the best suitable analytical criteria for guidelines on maximum tolerable metal load and in assessing biosignificance of metals in soil. *Schweiz. landwirtsch. Forsch.*, 23, 1984, s. 209-225.
- KACMÁR, P. - OGURČÁKOVÁ, K. - FEDOROVÁ, O. - ŠAMO, A.: Kadmium v orgánech a tkáních jatočného hovädzieho dobytku. *Veter. Med. (Praha)*, 25, 1980, s. 663-668.

KREUZER, W. - SANSONI, B. - KRACKE, W. - WISMATH, P.: Cadmium in Fleisch und Organen von Schachttieren. Fleisch - Wirtschaft, 3, 1975, s. 387-396.

LENER, J.: Účinky kadmia na organismus. Českoslov. Hyg., 14, 1969, s. 327-334.

ORSKOV, E. R. - FLATT, W. P. - MOE, P. W.: Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acids production in ruminants. J. Dairy Sci., 51, 1968, s. 1420-1435.

SHARMA, R. P. - STREET, J. C. - VERMA, M. P. - SHUPE, J. L.: Cadmium uptake from feed and its distribution to food products of livestock. Envir. Hlth Perspect., 28, 1979, s. 59-66.

Došlo 21. 12. 1992

SVIATKO, P. - ZELENÁK, I. (Institute of Animal Physiology of the Slovak Academy of Sciences, Košice):

The influence of cadmium on parameters of rumen fermentation and its content in biological materials in sheep.

Vet. Med. Czech, 38, 1993 (4): 229-235.

The experiment was carried out with three groups, each consisting of six adult sheep of the Merino breed weighing 40 - 45 kg, fed with the diet composed of 1 kg of meadow hay and an addition of 0.2 kg of barley meal for 3 weeks before the experiment. The first group - the control - was provided the natural supply 0.09 mg Cd/kg DM of the diet, the supply of 1st experimental group was increased by 5 mg Cd/kg DM and of the 2nd experimental group by 10 mg Cd/kg of diet DM in the form of sulphate. The influence of mentioned cadmium doses on levels of volatile fatty acids, their energetic yield and proportion of their energy and energy of methane and bacterial mass from the energy of fermented feed hexose, as well as the total number of infusoria and number of infusoria of *Entodinium* sp. in the ruminal fluid of sheep with an increased supply of cadmium were examined during seven weeks. In addition to that cadmium contents in the liver, kidneys, muscles, excrements and ruminal fluid was investigated. Obtained results indicate that yet a lower supply of cadmium amounting to 5 mg and 10 mg/kg DM of the sheep diet, had significant negative influence (Tab. I) on the production of isobutyric acid in rumen fluids and decreased significantly (Tab. III) the total counts of infusoria and number of *Entodinium* sp. infusoria in the rumen fluids of sheep. No significant influence of the mentioned cadmium supply on parameters of rumen fermentation - energetic yield of VFA and proportion of their energy and methane energy and bacterial mass from the energy of fermented feed hexose (Tab. II) was detected. The stated amounts of cadmium in the diet significantly affected the increase of its content (Tab. IV) in kidneys, liver, rumen fluid and excrements. No significant influence of mentioned cadmium additions on its content in wool and muscles was observed.

sheep; cadmium content; rumen fermentation parameters; counts of infusoria; organs

Contact Address:

MVDr. Peter S v i a t k o, CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Palackého 12,
040 01 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 36251, fax 095 24491

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 5/1993 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny tyto příspěvky:

Vilček Š.: *In vitro* amplifikácia fragmentu genómu vírusu slizničnej choroby (BVD-MD) PCR metódou

Lauková A.: Antagonistická aktivita bachorových baktérií *Enterococcus faecium* a *Staphylococcus warneri*

Bomba A., Žitňan R., Koniarová I., Stachová M., Kolodzieyski L., Feješ J., Lenárt J.: Stimulácia bachorovej fermentácie cicajúcich jahniat

Košutzký J., Košutzká E., Lenčuchová L.: Dlhodobá expozícia brojlerových kurčiat PCB - metabolické a imunologické účinky

Jankela J., Baranovská M., Antalíková J.: Formy xantin oxidoreduktázy v tkanivách japonskej prepelice

Hejlíček K., Tremel F.: Výskyt mykobakteriôzy u voľne žijícího ptactva v různých epizootologických poměrech tuberkulózy drůbeže

POROVNÁNÍ RŮZNÝCH ANTIGENŮ PRO DIAGNOSTIKU CAEV TESTEM ELISA

Celer V. Jr.¹, Zanoni R. G.², E. Peterhans²

¹*Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Brno*

²*Virologický ústav-Univerzita, Bern*

K diagnostice onemocnění CAE (kozí arthritis a encephalitis) jsme použili detekci protilátek v séru a mléce vyšetřovaných zvířat testem ELISA. Jako antigen jsme použili virus Maedi-Visna a virus CAE pěstované na tkáňových kulturách a rekombinantně připravený korový protein viru Maedi-Visna. Výsledky získané vyšetřením 130 kozích sér prokázaly použitelnost obou celovirových antigenů při diagnostice CAE. Detekce antivirových protilátek rekombinantním proteinem byla specifitější, ale méně citlivá než u celovirových antigenů. Jako referenční metodu při odlišných výsledcích testu ELISA jsme použili imunoblot. Detekce protilátek ve vzorcích mléka byla při srovnatelné citlivosti specifitější.

CAEV; Maedi-Visna; ELISA

Koží arthritis a encephalitis (CAE) spolu s Maedi-Visna (M.V.) ovci jsou celosvětově rozšířená onemocnění malých přežvýkavců vyvolávaná lentiviry. Původci obou onemocnění si jsou velmi podobní antigenní strukturou, fyzikálně chemickými a biologickými vlastnostmi (Dahlberg aj. 1981). Jako hlavní klinické příznaky bývají u obou nález popisovaný pneumonie, záněty kloubů (především karpálních) a mastitidy (Crawford a Adams, 1981; Narayan aj., 1985). Encefalická forma je u onemocnění Maedi-Visna méně častá, avšak u CAE tvoří významnou součást klinické manifestace především u kůzlat do věku 4-6 měsíců (Cork aj., 1974). Země s intenzivním chovem ovcí a koz věnují tlumení obou onemocnění značnou pozornost. Diagnostika obou virových onemocnění je založena na detekci protilátek v séru vyšetřovaných zvířat imunodifúzním testem nebo metodou ELISA (Cutlip aj., 1977; Houwers a Gielkens, 1979). Protože diagnosticky významné korové proteiny (p25) obou virů jsou antigenně velmi blízké (Gogolewski aj., 1985), porovnávali jsme možnost detekce protilátek proti CAEV antigenem heterologním (připraveným z viru M.-V. kultivovaném na buněčné kultuře nebo rekombinantně připraveným korovým proteinem p25 tohoto viru) s antigenem homologním (CAEV).

MATERIÁL A METODA

VIRUS

Pracovali jsme s virem Maedi-Visna (kmen OLV) izolovaným z ovce a virem CAE (kmen G122c) izolovaným z kozy. Oba kmeny byly získány ze serologicky

pozitivních zvířat s klinickými příznaky onemocnění ve Virologickém ústavu v Bernu.

BUNĚČNÉ KULTURY

Ke kultivaci viru jsme používali buňky LSM (lamb synovial membrane) získané trypsinováním synoviální membrány karpálního kloubu jehněte a pěstované v MEM s přidávkou 7 % fetálního séra (FS), glutaminu a antibiotik. Buňky jsme používali ke kultivaci viru až do 30. pasáže.

KONCENTRACE A PURIFIKACE VIRU

Infikovaný supernatant byl sklizen 7. den (OLV) a 14. den (G122c) po infekci, v době s maximálně vyvinutým cytopatickým efektem (cytopatický efekt v podobě mnohojaderných buněk postihujících 80 % povrchu monolayeru). Supernatant byl předčištěn centrifugací 7500 rpm/30 min (rotor A 6.9).

Virus byl koncentrován ultracentrifugací 17 000 rpm/3 h (Beckman, rotor Ty 19), dále purifikován na vrstvách 17 % sacharózy a 40 % tartarátu draselného s následným peletováním přes vrstvu 25 % sacharózy 35 000 rpm / 55 min (rotor Beckman Sw 41). Takto koncentrovaný a purifikovaný virus byl resuspendován v 1/1000 původního objemu v 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,4 (TN puff).

PŘÍPRAVA ANTIGENU PRO TEST ELISA

Porovnávali jsme vhodnost těchto detergentů a tukových rozpouštědel k solubilizaci virových antigenů kmene OLV viru: SDS (dodecylsulfát sodný), etér a OGP (oktyl- β -D glukopyranosid).

Antigen jsme rozdělili na tři části, každou smíchali v poměru 1 : 1 s příslušným detergentem a nechali působit za následujících podmínek:

- SDS 10 min / 37 °C; 0,125 %
- etér 10 min / 20 °C; 50 %
- OGP 2 hod / 37 °C; 2 %.

Účinnost solubilizace jsme porovnávali na základě dosažených hodnot absorbance v ELISA testu se známým pozitivním sérem. Každý antigen jsme testovali v ředění 1:100 a 1:200.

Kontrolní negativní antigen byl připraven z neinfikované buněčné kultury stejným způsobem. Rekombinantní antigen a jeho přípravu popsal Z a n o n i a j. (1991).

TEST ELISA

Pozitivní i kontrolní antigen byl navazován v PBS pH 7,2 při teplotě 4 °C přes noc. Promývací roztok měl složení: PBS + 0,1 % Tween 20. Séra byla ředěna pro vyšetření 1 : 100 (PBS, 5 % Tween 20, 1 % odtučnělé mléko). Inkubace probíhala při teplotě 37 °C, po dobu 2 hodin. Jako konjugát jsme použili Protein G (Bioreba AG). Po 2 h inkubace při teplotě 37 °C jsme navázaný konjugát detekovali 250 mM H₂O₂ a ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonat). Intenzitu reakce jsme stanovili na vlnové délce 405 nm jako rozdíl absorbancí mezi jamkou s pozitivním

a kontrolním antigenem. Standardizace testu byla provedena na souboru 40 negativních sér z opakovaně vyšetřovaného stáda koz (negativita potvrzena imunoblotem).

Ze získaných hodnot absorbancí negativních sér byla vypočtena průměrná hodnota ($\bar{X}$) a směrodatná odchylka (S). Vzorec $\bar{X} + (3 \times S)$ pak udává hranici negativity. Jako kontrolní, slabě pozitivní sérum sloužil vzorek s absorbancí rovnou této hranici, který byl včleněn do každého testu. Vyšetřovaná séra s absorbancí vyšší než u kontrolního vzorku byla považována za pozitivní, séra s absorbancí 60 - 99 % kontrolního vzorku byla považována za dubiozní a byla prověřována imunoblotem.

SÉRA

K vyšetření jsme použili 130 vzorků kozích sér.

VZORKY MLÉKA

Testovali jsme 37 paralelních vzorků mléka a sér. Mléko bylo zbaveno tuku odstředěním a uchovávalo zamražené. Vzorky mléka byly vyšetřovány neředěné. Standardizace testu byla provedena stejným způsobem jako pro vzorky sér.

TITRACE VZORKŮ MLÉKA A SÉR

U vzorků mléka a sér čtyř zvířat předchozí skupiny jsme provedli titraci protilátek reagujících v testu ELISA. Vzorky sér byly ředěny až do 1 : 256 000, vzorky mléka do ředění 1 : 256 s koeficientem ředění 2. Za výsledný titr jsme považovali obrácenou hodnotu ředění, jehož absorbance byla blízká absorbanci slabě pozitivního kontrolního vzorku, který byl včleněn do každého testu.

SDS-PAGE A IMUNOBLLOT

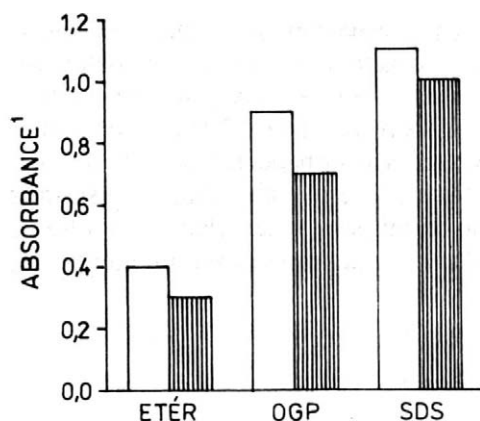
SDS-PAGE byl proveden standardní metodikou (L a e m m l i , 1970). Pracovali jsme s 3% zaostřovacím a 12% dělicím gelem na zařízení Protean II minigel equipment (Bio-Rad). Elektroforeticky rozdělené proteiny byly přeneseny na nitrocelulózu a specificky virové proteiny byly vizualizovány imunoblotem (Z a n o n i a j . , 1989). Za pozitivní byla považována séra zřetelně reagující s proteiny p25 a p15.

VÝSLEDKY

Vliv použití různých detergentů a tukových rozpouštědel na detekční schopnosti připraveného antigenu ukazuje obr. 1. Vzhledem k tomu, že nejefektivnější solubilizace viru jsme dosáhli pomocí SDS, používali jsme tento detergent pro rutinní opracování antigenu.

Tab. I obsahuje výsledky porovnání tří různých antigenů na souboru 130 sér. Antigeny celovirové s téměř kompletní výbavou virových proteinů prokázaly vyšší citlivost ve srovnání s antigenem rekombinantním. Antigen homologní (CAEV - G122c) byl citlivější než antigen heterologní (M.V. - OLV), i když s vyšším procentem nespecificky pozitivních výsledků.

Tab. II znázorňuje porovnání výsledků detekce protilátek viru CAE v mléce a séru 37 zvířat celovirovými antigeny. Ve vzorcích mléka jsme zachytili oběma



1. Výsledek opracování různých ředění antigenu Maedi-Visna éterem, SDS (dodecylsulfát sodný) a OGP (oktyl-3-d glukopyranosid); □ 1:100, ▨ 1:200 — The result of solubilization of various Maedi-Visna antigen dilutions with ether, SDS (sodium dodecylsulphate) and OGP (octyl-3-d glucopyranoside); □ 1:100, ▨ 1:200¹ absorbancy

antigeny větší počet pozitivních reagentů při sníženém procentu nespecificky pozitivních výsledků než ve vzorcích sér. Rekombinantní antigen nebyl k vyšetření mléka použit.

Tab. III ukazuje srovnání titru protilátek v náhodně vybraných čtyřech vzorcích mléka a sér. Titr protilátek v séru dosahuje 25 - 100násobku titru v mléce.

DISKUSE

Kultivace lentivirů malých přežvýkavců na buňkách synoviální membrány je výhodná pro snadnou dostupnost uvedené tkáně a pro její vnímavost k infekci až do vysoké pasáže (vlastní nepublikované výsledky).

Námi použitý způsob koncentrace a purifikace viru umožňuje získat antigen k testu ELISA v dostačující čistotě pro omezení velké části nespecifických reakcí. Podle autorů *Brunsa* a *Frenzel* (1979) je však jeho nevýhodou ztráta povrchového glykoproteinu gp 135 při koncentraci odstředěním. Hlavními diagnostickými antigeny proto po koncentraci zůstávají korový protein p 25 a p 17 (vlastní nepublikované výsledky).

Vzhledem k nízké detekční schopnosti nesolubilizovaných celovirových antigenů jsou v práci uváděny pouze výsledky dosažené po opracování antigenů třemi různými detergenty. Účinnost solubilizace byla ověřována pouze u kmene OLV viru M.-V. a byla interpolována i na virus CAEV.

Dosažené výsledky srovnání homologního a heterologního antigenu potvrzují jejich blízkou antigenní příbuznost (*Gogolewskij*, 1985).

Nepatrně vyšší počet pozitivních reagentů u homologního testu je způsoben pravděpodobně větším počtem nespecifických reakcí, než větší afinitou protilátek k antigenu CAEV.

Vyšší citlivost celovirových antigenů ve srovnání s antigenem rekombinantním lze vysvětlit zčásti rozdílným spektrem diagnostických proteinů, zčásti záměrným snížením citlivosti rekombinantního testu ve snaze redukovat výskyt nespecificky pozitivních výsledků při jeho komerčním využití.

I. Porovnání antigenů CAEV (C), Maedi-Visna (M) a rekombinantně připraveného antigenu Maedi-Visna (R) na vzorcích sér - The comparison of CAEV (C), Maedi-Visna (M) antigens and recombinant antigen Maedi-Visna (R) in blood serum samples

C \ M					R \ M					R \ C				
	-	+/-	+	Celkem		-	+/-	+	Celkem		-	+/-	+	Celkem
-	58	2	1	61	-	68	5	3	76	-	68	5	3	76
+/-	6	1	2	9	+/-	3	4	17	24	+/-	2	1	21	24
+	7	7	46	60	+	0	1	29	30	+	0	0	30	30
Celkem ¹	71	10	49	130	Celkem	71	10	49	130	Celkem	70	6	54	130

Imunoblot: 60x pozitivní / 70x negativní - Immunoblotting: 60 times positive / 70 times negative

C: 4x nespecificky pozitivní/0x nespecificky negativní - 4 times nonspecifically positive/0 times nonspecifically negative

M: 1x nespecificky pozitivní/4x nespecificky negativní - once nonspecifically positive/4 times nonspecifically negative

R: 0x nespecificky pozitivní/9x nespecificky negativní - 0 times nonspecifically positive/9 times nonspecifically negative

¹total

II. Porovnání antigenů CAEV a Maedi-Visna na vzorcích mléka (M) a sér (S) - The comparison of CAEV and Maedi-Visna antigens in milk samples (M) and in blood serum samples (S)

CAEV					M. V.				
S \ M	-	+/-	+	Celkem	S \ M	-	+/-	+	Celkem
-	5	0	0	5	-	5	1	2	8
+/-	0	1	1	2	+/-	0	1	8	9
+	1	2	27	30	+	0	0	20	20
Celkem ¹	6	3	28	37	Celkem	5	2	30	37

Imunoblot (mléko): 32x pozitivní / 5x negativní - Immunoblotting (milk): 32 times positive / 5 times negative

CAEV: 0x nespecificky pozitivní / 1x nespecificky negativní - 0 times nonspecifically positive / once nonspecifically negative

M.V.: 0x nespecificky pozitivní / 0x nespecificky negativní - 0 times nonspecifically positive / 0 times nonspecifically negative

¹total

III. Porovnání titru protilátek ve vzorcích mléka a sér - The comparison of antibody titres in milk and blood serum samples

Číslo vzorku ¹	Hodnoty titru ²	
	sérum ³	mléko ⁴
1119	12 800	256
76	25 600	256
1165	1 600	16
1124	6 400	256

¹sample No., ²titre values, ³blood serum, ⁴milk

Použití vzorků mléka k detekci antivirových protilátek bylo již s úspěchem použito například v případě enzootické leukózy skotu (Tomaj, 1984; Florentaj, 1988). Výhodou je především snadnější odběr velkého počtu vzorků a odpadá nutnost jejich ředění před vyšetřením. Při zachování srovnatelné citlivosti je test dokonce specifitější.

Námi zjištěný 25-100násobný rozdíl v titru protilátek v odpovídajících vzorcích sér a mléka je vyšší než uvádějí Mammereickaj. (1985) u enzootické leukózy skotu. Naše výsledky získané titrací zatím pouhých čtyř vzorků však nejsou statisticky významné.

Literatura

- BRUNS, M. - FRENZEL, B.: Isolation of a glycoprotein and two structural proteins of Maedi-Visna. *Virology*, 97, 1979, s. 207-211.
- CORK, L. C. - HADLOW, W. J. - CRAWFORD, T. B. - GORHAM, J. R. - PIPER, C. E.: Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J. infect. Diseases*, 129, 1974, s. 134-141.
- CRAWFORD, T. B. - ADAMS, D. S.: Caprine arthritis-encephalitis: Clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *JAVMA*, 178, 1981, č. 7, s. 713-719.
- CUTLIP, R. C. - JACKSON, T. - LAIRD, G.: Prevalence of ovine progressive pneumonia in a sampling of cull sheep from western and midwestern United States. *Amer. J. veter. Res.*, 38, 1977, s. 2091-2093.
- DAHLBERG, J. E. - GASKIN, J. M. - PERK, K.: Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J. Virol.*, 39, 1981, č. 3, s. 914-919.
- FLORENT, G. - DELGOFFE, J. C. - ZYGRAICH, N.: Detection of antibodies to bovine leukemia virus in bovine milk samples with an ELISA involving two monoclonal antibodies. *Veter. Microbiol.*, 18, 1988, s. 89-93.
- GOGOLEWSKI, R. P. - ADAMS, D. S. - MCGUIRE, T. C. - BANKS, K. L.: Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, Visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J. gen. Virol.*, 66, 1985, s. 1233-1240.
- HOUWERS, D. J. - GIELKENS, A. L. J.: An ELISA for the detection of Maedi/Visna antibody. *Veter. Rec.*, 30, 1979, s. 611.
- LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 1970, s. 680-685.
- MAMMERICKX, M. - PORTETELLE, D. - BURNY, A.: Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) involving monoclonal antibody for detection of BLV antibodies in individual or pooled bovine milk samples. *Zbl. Veter. Med., R.B.*, 32, 1985, s. 526-533.
- NARAYAN, O. - SHEFFER, D. - CLEMENTS, J. E. - TENNEKON, G.: Visna viruses a unique interferon during interaction between lymphocytes and infected macrophages. *J. exp. Med.*, 162, 1985, s. 1954-1969.
- TOMA, B. - VUILLAUME, A. - MANET, G. - DURET, C. - ELOIT, M. - CRESPEAU, F. - CHAPPUIS, G. - PARODI, A. L.: Dépistage de la leucose bovine enzootique par application du test elisa sur le lait. *Rev. Méd. vétér.*, 160, 1984, č. 1, s. 53-60.
- ZANONI, R. - KRIEG, A. - PETERHANS, E.: Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. *J. clin. Microbiol.*, 27, 1989, č. 3, s. 580-582.
- ZANONI, R. - NAUTA, I. M. - PAULI, U. - PETERHANS, E.: Expression in *Escherichia coli* and sequencing of the coding region for the capsid protein of dutch Maedi-Visna virus strain ZZV 1055: Application of recombinant protein in enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of caprine and ovine lentiviruses. *J. clin. Microbiol.*, 29, 1991, č. 7, s. 1290-1294.

Došlo 3.8.1992

CELER, V. Jr. - ZANONI, R. - PETERHANS, E. (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno; Institute of virology, University of Bern):

Comparison of different antigens for CAEV diagnosis by ELISA.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (4): 237-244.

The most adequate means of diagnosing infections with caprine arthritis encephalitis (CAE) and Maedi-Visna (MV) viruses is the demonstration of antibodies to these viruses in milk or in blood serum. Various techniques and a range of different antigen preparations can be used for this purpose. We have evaluated two different whole virus antigen preparations derived from lamb synovial cells infected with CAE and MV viruses and recombinant antigen containing the capsid protein expressed in *E. coli* in ELISA test.

The suitability of different detergents for solubilization of whole virus particles is shown in Tab. I. The detergents used were ether (50 %, 10 min, 37 °C), octyl- β -D glucopyranoside - OGP (2 %, 2 h, 37 °C), and sodium dodecylsulphate SDS (0.125 %, 10 min, 37 °C). Antigens prepared with SDS gave the best results and were then used in the following antigen comparative study.

All antigens (whole virus and recombinant core protein) were used for the coating of ELISA plates and were evaluated on a panel of 130 sera. In general, whole virus antigens prepared from CAE- and MV-viruses gave identical results. The specificity achieved with recombinant antigen was superior but the sensitivity was lower compared with whole virus antigen. Immunoblotting served as the gold standard for discordant results.

The other aim of our study was to compare antibody detection in blood serum and milk. Using whole virus antigen, antibodies could be detected with higher specificity and sensitivity in milk than in blood serum (Tab. II.).

Titration of blood serum and milk samples of four animals revealed the higher antibody titre in blood serum than in milk (Tab. III).

CAEV; Maedi-Visna; ELISA; milk; serum

Contact Address:

MVDr. Vladimír C e l e r Jr., Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Palackého 1/3,
612 42 Brno, Czech Republic
Tel. 05 7110, fax 05 748922

DEMONSTRATION OF PARVOVIRUS IN DIARRHOEIC AFRICAN CHEETAHS (*ACINONYX JUBATUS JUBATUS* SCHREBER, 1775)

L. Valíček¹, B. Šmíd¹, J. Váhala²

¹Veterinary Research Institute, Brno

²ZOO, Dvůr Králové nad Labem

Parvovirus was demonstrated in the intestinal content of diarrhoeic African cheetahs by electron microscopy. The virus was isolated in a feline kidney cell line inoculated with a filtrate of the intestinal content. Its growth characteristics, cytopathic effect, agglutination of porcine erythrocytes, structure, and results of immunoelectron microscopic examination were indistinguishable from those of feline panleukopenia virus.

cheetah parvovirus; electron microscopic demonstration; virus isolation; cytology; immunoelectron microscopy; haemagglutination

Feline panleukopenia virus (FPLV) and mink enteritis virus (MEV) class with parvoviruses which are also pathogenic to leopards, lions, tigers, panthers, and probably all other members of the family *Felidae*. Raccoons, ferrets and coatimundi are also susceptible, while all the other species are most probably resistant to the infection (P e d e r s e n, 1987). FPLV and MEV differ in only one of the 79 restriction sites of the virus genome, and are indistinguishable from each other when tested by conventional serological methods (T r a t s c h i n et al., 1989). FPLV is present in faeces of infected cats during the acute phase and shedding continues for several weeks after clinical signs have disappeared (P e d e r s e n, 1987).

A close antigenic relationship exists between FPLV and Type 2 of canine parvovirus (F l o w e r et al., 1980; A p p e l and P a r r i s h, 1987), the two viruses differing only in a few DNA bases (M c M a s t e r et al., 1981). Experimental infections of felids with canine parvovirus were successful only by parenteral route. Oral and other ways of infection were followed neither by virus replication, nor by seroconversion (L e s c u r e et al., 1980).

Diarrhoea with a probable viral origin developed in three African cheetahs kept in the zoological garden in Dvůr Králové nad Labem. Results of electron microscopical and virological examinations of samples of the intestinal content are presented in this paper.

MATERIAL AND METHODS

SAMPLE PROCESSING

20% suspensions in serum-free Earle's medium were prepared from intestinal contents of one male and two females, 3.5-month-old cheetahs suffering from di-

arrhoea. The suspensions were centrifuged (Janetzki K-24, 8,000 r.p.m., 30 min), a part of the supernatant was separated for electron microscopical examination and the rest was filtered through membrane filters (Millipore, 400 nm) to be used as inoculum of cell cultures.

ELECTRON MICROSCOPY

Samples of the supernatant were viewed in the electron microscope Tesla BS 500 after negative staining with 2% solution of ammonium molybdate (pH 6.8 - 7.0).

CELL CULTURES

A line of feline kidney cells and the canine kidney cell line MDCK were used in isolation experiments. Freshly seeded cell cultures in Eagle's medium E-MEM, containing 10 % of bovine blood serum, were inoculated with the filtrate of the intestinal content (0.5 ml per 1 Legroux flask). The medium was replaced by serum-free E-MEM after the cell monolayer became coherent. Cell cultures for cytological examinations were grown in the same way on slides in test tubes and inoculated with 0.2 ml of the filtrate per 1 slide. The cells were fixed in Bouin solution and stained with haematoxylin-eosine two to four days after the inoculation.

HAEMAGGLUTINATION TEST

Cell cultures were frozen-thawed four days after inoculation, serial twofold dilutions (1:2 - 1:4096) were prepared from the resulting suspension in 0.05 ml volumes on microtitre plates KOH-I-NOOR and 1% suspension of porcine erythrocytes in buffered physiological saline, pH 6.0 or 7.2, was added into each well. The plates were incubated at +4 °C for 16 to 20 hours.

IMMUNOELECTRON MICROSCOPY

Infected cell cultures were frozen-thawed and centrifuged (Janetzki K-24, 8,000 r. p. m., 30 min), and the supernatant was mixed with an equal volume of diluted equine hyperimmune serum to FPLV. After incubation, a drop of the antigen-antibody mixture was transferred onto an electron microscopic grid and stained with 2% ammonium molybdate. A commercial equine hyperimmune serum with FPLV-antibody titre 10^4 ND₅₀ (Feliserin, Austria) was used and tenfold dilution series 1:10 to 1:400 were prepared with buffered physiological saline (pH 7.0).

RESULTS

ELECTRON MICROSCOPY OF FAECAL SAMPLES

Envelope-free virus particles with diameters around 20 nm were demonstrated in the intestinal content of the diarrhoeic cheetahs by electron microscopy. Both empty and core-containing particles were observed. Single particles and large clusters thereof were present in the samples. The structure and size of the particles did not differ from those of parvoviruses (Fig. 1).

VIRUS ISOLATION, CYTOLOGY

Growing feline kidney cell cultures were infected. Cytopathic lesions, characterized by wrinkling and releasing of cells from the glass surface, developed two to four days after the cell layer became coherent. Cytological staining demonstrated sporadic eosinophilic intranuclear inclusions from post-inoculation Day 2 and their presence in a large number of nuclei from Day 4 (Fig. 2). The type of the cell damage and the location of inclusions were suggestive of parvovirus infection.

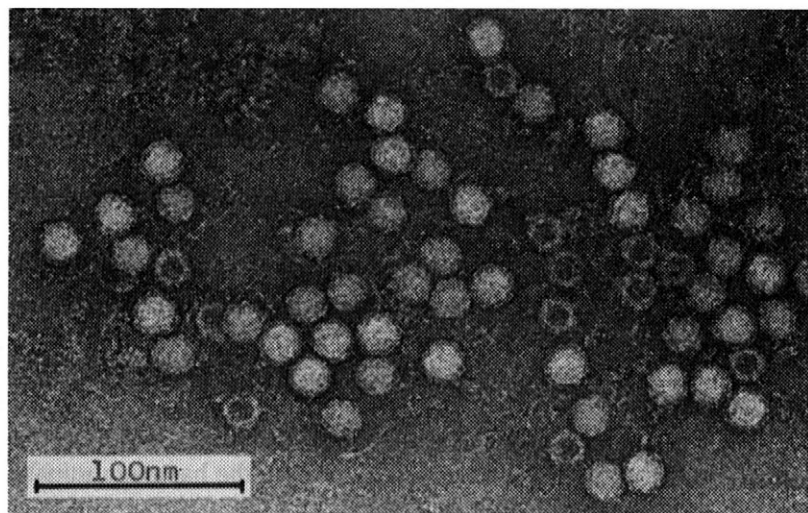
The canine kidney cell line MDCK was resistant to the infection and no cytopathic lesions nor intranuclear inclusions were demonstrable even after three passages.

ELECTRON AND IMMUNOELECTRON MICROSCOPY OF THE ISOLATE

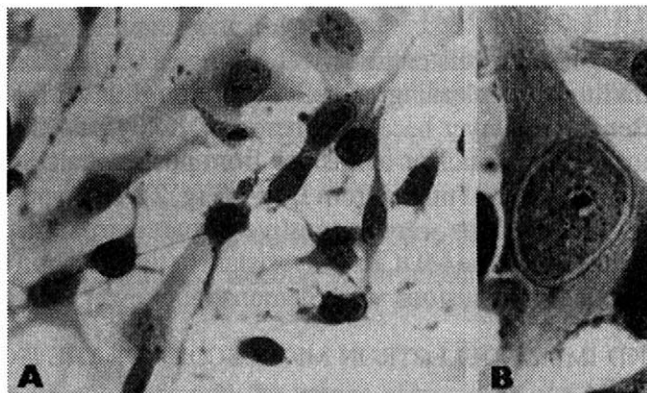
Virus particles, which, after negative staining were identical by their structure and size with virions demonstrated in the intestinal content of the affected cheetahs, were demonstrated by electron microscopy in the infected feline kidney cell cultures. Compared with the intestinal content, the amount of the virus in cell cultures was lower, and mostly single and only small clusters of three to five particles were observed. Incubation of the infected cell suspensions with equine hyperimmune serum to FPLV resulted in the formation of specific immune complexes. The largest of them, containing 50 or more particles, were formed during the incubation with the serum dilution 1:100. The structure of clustered virus particles was not as clear as in the direct negative staining, being more or less obscured by the bound antibodies.

HAEMAGGLUTININATING PROPERTIES

The parvovirus strain, isolated in the feline kidney cell line, agglutinated porcine erythrocytes (in the 1% suspension) at +4 °C. In the 3rd passage in cell cultures,



1. Full and empty parvovirus particles in the intestinal content of cheetahs. (Negative staining with 2% ammonium molybdate)



2. A - Numerous intranuclear inclusions in infected feline kidney cells; B - Detail of an intranuclear inclusion filling nearly the whole cell nucleus (haematoxylin-eosin)

the haemagglutination titre reached 1,024 after 16 to 20 hours of incubation at pH 6.0, but it was lower by 3 to 4 dilutions, i.e. 64 to 128 at pH 7.2.

DISCUSSION

The structure and size of both the virus demonstrated in the intestinal content and that isolated in feline kidney cell cultures corresponded to those of parvoviruses. The result of electron microscopic classification of the virus was confirmed by immunoelectron microscopy, which demonstrated formation of immune complexes during the incubation of the virus suspension with equine hyperimmune serum to FPLV.

The isolate induced cytopathic effect two to four days after infection of feline kidney cell cultures, and formation of intranuclear inclusions, suggestive of parvovirus infection (P e d e r s e n , 1987) was demonstrated by cytological staining. On the other hand, the isolate did not propagate in the canine kidney cell line MDCK and no intranuclear inclusions were demonstrable by cytological staining. This finding is consistent with the fact that FPLV propagates in feline and ferret, but not in canine, bovine, simian and human cells (P e d e r s e n , 1987).

One of the features differentiating feline and canine parvoviruses from each other is the effect of pH on their haemagglutinating activity. While FPLV agglutinates porcine erythrocytes most markedly at pH 6.0 and the agglutination is weaker or inapparent at pH 6.8 or higher, canine parvovirus haemagglutinates over a wide pH range, and will agglutinate at pH 7.2 whereas FPLV will not (C a r m i c h a e l et al., 1980). The haemagglutination titre of the parvovirus isolated from cheetahs was several times higher at pH 6.0 than at pH 7.2. Hence the haemagglutinating activity of the isolate corresponded to that of FPLV.

The properties of our parvovirus isolate and the earlier finding that FPLV was pathogenic also to other felids (P e d e r s e n , 1987) allow us to assume that the causal agent of diarrhoea in African cheetahs was FPLV. The isolate has been in-

cluded in the Collection of Animal Pathogenic Microorganisms in Brno as cheetah parvovirus under the code CAPM V-452.

References

- APPEL, M. - PARRISH, C. R.: Canine parvovirus type 2. In: Virus infections of carnivores. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, Elsevier 1987, s. 69-72.
- CARMICHAEL, L. E. - JOUBERT, J. C. - POLLOCK, R. V. H.: Haemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. Amer. J. veter. Res., 41, 1980, s. 784-791.
- FLOWER, R. L. P. - WILCOX, G. E. - ROBINSON, W. F.: Antigenic differences between canine parvovirus and feline panleukopenia virus. Veter. Rec., 107, 1980, s. 254-256.
- LESCURE, F. - GUELFI, J. F. - REGNIER, A.: La parvovirose du chien. Rev. Med. Veter. (Toulouse), 131, 1980, s. 7-12.
- Mc MASTER, G. - TRATSCHIN, J. D. - SIEGL, G.: Comparison of canine parvovirus with mink enteritis virus by restriction site mapping. J. Virol., 38, 1981, s. 368-371.
- PEDERSEN, N. L.: Feline panleukopenia virus. In: APPEL, M. J. (ed.): Virus infections of carnivores. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, Elsevier 1987, s. 247-254.
- TRATSCHIN, J. D. - Mc MASTER, G. K. - KRONAUER, R. - SIEGL, G.: Canine parvovirus: Relationship to wild-type and vaccine strains of feline panleukopenia virus and mink enteritis virus. J. gen. Virol., 61, 1982, s. 33-41.

Došlo 5. 10. 1992

VALÍČEK, L. - ŠMÍD, B. - VÁHALA, J. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Zoologická zahrada, Dvůr Králové nad Labem):

Průkaz parvoviru u průjmučících gepardů štihlých (*Acinonyx jubatus jubatus* Schreber, 1775).

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (4): 245-249.

Ve střevním obsahu průjmučících gepardů štihlých byly elektronově mikroskopicky prokázány parvoviry. Po infekci buněčné linie kočičích ledvinových buněk střevním filtrátem byl izolován virus, který se růstovými vlastnostmi, charakterem cytologických změn, schopností hemaglutinovat prasečí erytrocyty, strukturou a na základě výsledků imunoelektronové mikroskopie nelišil od viru panleukopenie koček. Izolovaný parvovirus byl zařazen do Sbírký zoopatogenních mikroorganismů v Brně pod označením CAPM V-452.

parvovirus gepardů; elektronově mikroskopický průkaz; izolace viru; cytologie; imunoelektronová mikroskopie; hemaglutinace

Contact Address:

MVDr. Lubomír Valíček, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 741121, fax 05 752240

RECENZE

MORFOLOGIE HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT

F. Marvan a kol.

VŠZ Praha a VŠZ Brno, Zemědělské nakladatelství Brázda 1992. 304 s.

Koncem roku 1992 vydal prof. MVDr. F. Marvan, DrSc., ve spolupráci s celým autorským kolektivem učitelů z Prahy, Brna a Nitry (prof. MVDr. A. Hampel, CSc., MVDr. E. Hložánková, CSc., prof. ing. J. Kresan, CSc., doc. MVDr. ing. L. Massana, DrSc., doc. MVDr. E. Vernerová, CSc.) velmi potřebnou a dosud chybějící vysokoškolskou učebnici pro studenty vysokých škol zemědělských. Učebnice jistě dobře poslouží svou přehledností i studentům a absolventům veterinární medicíny především proto, že podává ucelený pohled na stavbu a skladbu těla hospodářských zvířat. Učebnice, sestavená do 17 kapitol (nauka o buňce, nauka o tkáních, vznik a vývoj jedince, základní anatomické pojmy, soustavy: kosterní, svalová, trávicí, dýchací, močová, pohlavní, cévní, kožní, endokrinní a nervová, smyslové ústrojí a anatomie hospodářských ptáků), u nás vůbec poprvé v rozsahu pouhých 300 stran podává pro potřebu zemědělských i veterinárních odborníků kompletní informace podle současných poznatků. Přehlednost knihy je dána i dokonalým obrázkovým vybavením (249 většinou dvoubarevných a 20 dokonalých barevných). Autorem obrázků je doc. MVDr. K. Jelínek, CSc.

Komplexní pohled, podaný v učebnici, je nezbytný pro pochopení fyziologických funkcí, biologických i genetických jevů a chovu zvířat. Kniha bude jistě přínosem i pro biologicky orientované odborníky i ochránce zvířat.

Prof. MVDr. Dr. h. c. Zdeněk Sova, DrSc.

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Za Prof. Dr. Ing. JURAJOM GABRIŠOM, DrSc.

Dňa 18. októbra 1992 vo veku 72 rokov zomrel Prof. Dr. Ing. Juraj Gabriš, DrSc. Odišiel z našich radov dlhoročný spolupracovník, vzácny človek, učiteľ, vedec a priateľ. Prvý vedúci Katedry zootechniky a veterinárnej genetiky VŠV v Košiciach.

Prof. Dr. Ing. Juraj Gabriš, DrSc. sa narodil 31.1.1920 v Čadci. Po absolvovaní reálky študoval pedagogiku v Bratislave, neskoršie SVŠT, ktorú ukončil v roku 1946. V roku 1949 úspešne zložil doktorát technických vied. Po ukončení štúdia pracoval ako asistent na VŠPL v Košiciach a od roku 1950 začal svoju nepretržitú pedagogickú činnosť ako odborný asistent na Katedre výživy hospodárskych zvierat VŠV v Košiciach. V roku 1952 bol menovaný za vedúceho katedry všeobecnej a špeciálnej zootechniky. Už ako docent v roku 1961 úspešne obhájil kandidátsku dizertačnú prácu, v roku 1976 dosiahol vedeckú hodnosť doktora veterinárnych vied a o dva roky neskôr bol vymenovaný za profesora z vedného odboru všeobecná a špeciálna zootechnika.

Pedagogicko-výchovnú činnosť vykonával vo všetkých smeroch štúdia veterinárnych lekárov a poľnohospodárskych inžinierov. Významne sa podieľal na rozvoji novovzniknutej katedry a na výskumnej činnosti. Svojimi experimentálnymi prácami, biometrickým štúdiom, hodnotením hematologických ukazovateľov, štúdiom rastu a vývinu úžitkových vlastností ako aj vzťahom organizmu a prostredia prispel k zvyšovaniu úžitkovosti hospodárskych zvierat. Bohatá odborná prax, rozvinutá výskumná činnosť a životné skúsenosti boli dobrou zárukou pre rozvoj malého kolektívu bývalej katedry zootechniky, ako zaistiť výuku na žiadanej úrovni v pregraduálnej a postgraduálnej výchove. Ako pedagóg vytváral podmienky pre odborný rast učiteľov katedry a v pomerne krátkom čase vydal učebné pomôcky z disciplín, ktoré prednášal.

Bol zakladateľom detašovaného pracoviska VÚŽV v Nitre pri Katedre všeobecnej a špeciálnej zootechniky, kde úspešne riadil výskumnú činnosť v oblasti plemenárskej biológie a šľachtenia hospodárskych zvierat až do odchodu do dôchodku. veľmi plodná a rozsiahla bola výskumná činnosť v oblasti vedeckých prác kolektívneho charakteru. Dokumentujú to desiatky úspešne obhájených záverečných správ a výskumných úloh, vyše 350 vedeckých a odborných publikácií, vrátane monografií, učebníc, skript a knižných publikácií vydaných doma i v zahraničí.

Svoje vedecké poznatky a skúsenosti odovzdával nielen študentom, ale aj aspi-
rantom. Počas pôsobenia na škole aktívne spolupracoval s viacerými ústavmi na Slovensku, v Čechách ako člen vedeckých rád, člen rôznych komisií, oponent záverečných správ, kandidátskych, habilitačných a doktorských prác. Všade poradil,

pomohol svojimi poznatkami a skúsenosťami, preto v odborných kruhoch požíval dôveru a vážnosť.

Rozsiahla a aktívna bola jeho činnosť aj mimo školy. Bol členom edičnej rady a predsedu edičnej komisie pre živočíšnu výrobu nakladateľstva Príroda v Bratislave, člen živočíšneho odboru ČSAZ a predsedu Komisie genetiky a plemenitby hospodárskych zvierat.

Prof. Dr. Ing. Juraj Gabriš, DrSc. odišiel spomedzi nás ako človek, ktorý si čestne splnil svoje poslanie pedagóga a vedeckého pracovníka. Pre svojich kolegov, spolupracovníkov, študentov a poľnohospodárskych pracovníkov ostane v trvalej pamäti jeho húževnatosť, vytrvalosť, odborná erudícia, mimoriadny pracovný elán a nadšenie pre tvorivé vedecké poznanie.

Doc. MVDr. Augustín Ďuraň, CSc. a spolupracovníci

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Za Prof. MVDr. EMANUELEM KRÁLEM

Od blahopřání k osmdesátinám profesora MVDr. E. Krále na stránkách Veterinární medicíny (36, 1991, č. 10, s. 624) uplynula poměrně krátká doba, kdy musíme se smutkem konstatovat, že se 7. ledna 1993 navždy zastavilo srdce tohoto významného představitele československé veterinární medicíny. Rodák z Kutné Hory (19.10.1911) po absolvování Vysoké školy zvěrolékařské v Brně v roce 1934 spojil s touto školou celý svůj další život. Stal se její výraznou osobností a uznávaným reprezentantem doma i v zahraničí. Obdivuhodný byl rozsah jeho působení. Ideově a organizačně vybavil v celé šíři disciplínu veterinární chirurgie, ortopedie a rentgenologie, v jejímž čele stál více než 30 let. Právem je označován za zakladatele moderní československé veterinární ortopedie. Památka na vynikajícího pedagoga zůstane zachována ve vzpomínkách několika tisíců veterinárních lékařů a zapsána v řadě učebnic a učebních textů, jichž je autorem nebo spoluautorem. Dlouhá léta se podílel na tvorbě časopisů Veterinární medicína, Veterinářství, Folia veterinaria jako předseda nebo člen redakčních rad, na vydávání encyklopedických textů a na publikacích historických článků. S jeho jménem by měl natrvalo zůstat spojen moderní pavilon chirurgicko-ortopedické kliniky, který by neexistoval bez jeho vytrvalého mnohaletého snažení. Byl zakladatelem chirurgické sekce Společnosti veterinárních lékařů a řadu let nejen předsedou, ale především jejím *spiritus movens*. Přes zdravotní potíže, menší i větší příkoří nedávno minulé doby nikdy neztratil svůj optimismus a pracovní entuziasmus. Ještě mnoho let po odchodu do důchodu se velmi aktivně podílel na výstavbě školy a téměř do posledních dní svého plodného života udržoval se školou kontakt, zejména s chirurgickou klinikou.

Pro nás žáky zůstává pan profesor Král trvalým vzorem učitele, u něhož se snoubila velikost ducha s nevšední pracovitostí, nesmírnou pílí a houževnatostí.

*Prof. MVDr. Ján K o t t m a n, CSc.,
doc. MVDr. Ladislav N ě m e č e k, CSc.*

POKYNY PRO AUTORY VĚDECKÉHO ČASOPISU VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem.

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo 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 a kvalitě práce.

Rozsah vědeckých prací nemá přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI (ČSN 01 1300).

Technická úprava rukopisu

Úprava rukopisu pořizovaného na psacím stroji má odpovídat ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, tzn., že mezi řádky se dělají dvojité mezery). Při pořizování rukopisu na počítači je pro nás nejvhodnější textový editor T602, popř. text převedený do ASCII kódu. Text příspěvku se posílá spolu s disketou, která po zkopírování se vrací autorům zpět.

Ilustrace, grafy, tabulky a fotografie (černobílé) mají vyhovovat ČSN 88 2109, dodávají se zvlášť a nepodlepují se. Grafy se rýsují tuší na bílý nebo pauzovací papír a popisují se jednotnou velikostí písma (šablona 3,5 mm). Obrázky pořizované počítačem je možné publikovat přímo, pokud jsou ve formátu vektorovém (.GEM, .WMF, .CDR, atd.) nebo bitovém (.TIF, .PCX, atd.). 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 (titul) nemá přesahovat 85 úhozů. Je nutné se v názvu vyvarovat obecných frází jako: Studie o... Příspěvek k ... Pokus o... Každý zaslaný článek musí být samostatnou prací, nemohou být publikovány články na pokračování, označené např.: Studie o ... I, II, III atd., stejně tak jsou vyloučeny podtitulky článků.

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

Souhrn

Vypracování souhrnu je nutné věnovat obzvláštní péči. Autor do něho má shrnovat 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 pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, nemá ji však nahradit. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl psán celými větami, nikoliv heslovitě. 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: Vet. Med. - Czech, 00, 1990. Místa označená nulami doplní na kompletní citaci při korektuře redakce.

Klíčová slova (key words, index terms)

Připojují se po vynechání řádku pod souhrn krátký i rozšířený (k oběma souhrnům musí být připojena stejná klíčová slova). Klíčové slovo je substantivum, které je nutné pro věcné zařazení práce. Klíčová slova se řadí směrem od obecnějších výrazů ke konkrétním. Začínají malým písmenem a oddělují se středníkem. Jejich počet závisí na povaze práce, neměl by klesnout pod tři a převýšit 12 slov.

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 pouze 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.

Poděkování

Je-li to nutné, uvádí se stručné poděkování (jedna až dvě věty), např.: za technickou spolupráci, za pomoc při statistickém zpracování, za poskytnutí méně běžného léčiva apod.

Literatura

Musí odpovídat státní normě ČSN 01 0197. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů: příjmení (verzálkami), zkratka jména, plný název práce, úřední zkratka časopisu, ročník, rok vydání, první stránka, poslední stránka; u knih je uvedeno místo vydání, vydavatel a rok. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

Adresa autora

Na zvláštním listě uvede autor akademický titul, jméno (ne jen zkratku), příjmení, vědeckou hodnost a podrobnou adresu pracoviště s PSČ. Totéž uvede i pro spoluautory.



**VÝHODNÝ LEASING
STROJŮ A ZAŘÍZENÍ
NEJEN PRO ZAČÍNÁJÍCÍ
PODNIKATELE**

ADEKO a. s. Vám nabízí

- ☐ kapitálovou účast v jiných podnikatelských subjektech
- ☐ společné podnikání
- ☐ poradenskou, konzultační a zprostředkovatelskou činnost v oboru ekologie
- ☐ investorskou a investiční činnost
- ☐ řešení odbytových potíží výrobcům a obchodním organizacím formou leasingového financování

**ADEKO a. s.
Slezská 7
120 56 Praha 2**

**tel.: 258 342
fax: 207 229**



OBSAH — CONTENTS

Vilček Š., Deliová I., Forgáč O., Strojný L., Harvan M., Benko G.: Detekcia boviného herpesvírusu-1 metódou dot-blot hybridizácie — Detection of bovine herpesvirus-1 by the dot-blot hybridization method	193
Paulík Š., Slanina L., Dubaj J., Széchenyi Š., Benko G.: Preventívne a metafylaktické použitie preparátov Alga a Algalev pri diarhoickom, resp. respiračnom syndróme — Preventive and metaphylactic administration of Alga and Algalev preparations in diarrhoeic and/or respiration syndrome	203
Ryšánek D., Schlegelová J.: Účinnost BR-TESTU a INTESTU při stanovení reziduí chemoterapeutik v syrovém a prezervovaném mléce — The efficiency of BR-TEST and INTEST in determination of chemotherapeutic residues in raw and preserved milk	215
Pazdera J., Hruban V., Pichrtová J., Müller Z., Jílek F.: DNA fingerprinting u koní — DNA fingerprinting in horses.	223
Sviatko P., Zeleňák I.: Vplyv kadmia na ukazovatele bachorovej fermentácie a jeho obsah v biologickom materiáli oviec — The influence of cadmium on parameters of rumen fermentation and its content in biological materials in sheep.	229
Celer V. Jr., Zanon R. G., Peterhans E.: Porovnání různých antigenů pro diagnostiku CAEV testem ELISA — Comparison of different antigens for CAEV diagnosis by ELISA.	237
Valíček L., Šmíd B., Váhala J.: Demonstration of parvovirus in diarrhoeic African cheetahs (<i>Acinonyx jubatus jubatus</i> Schreber, 1775) — Průkaz parvoviru u průjmujících gepardů štihlých (<i>Acinonyx jubatus jubatus</i> Schreber, 1775)	245
RECENZE	
Sova Z.: F. Marvan a kol.: Morfologie hospodářských zvířat	250
Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA	
Za Prof. Dr. Ing. Jurajom Gabrišom, DrSc.	251
Za Prof. MVDr. Emanuel Králem	253

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Česká akademie zemědělských věd a Slovenská akadémia pôdohospodárskych vied - Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Vychází měsíčně ● Redaktorka: ing. Zdenka Radošová ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/257541 ● Sazba: Studio DOMINO - ing. Jakub Černý, Popovice 144, 267 01 Králův Dvůr, tel.: 0311/22959 ● Tisk: OSTRAVSKÉ TISKÁRNY, Novinářská 7, 709 00 Ostrava 1 ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1993

Rozšiřuje PNS a. s. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá každá administrace PNS, doručovatel tisku a Administrace centralizovaného tisku, Hvoždanská 5-7, 149 00 Praha 4-Roztyly.