

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

5

ROČNÍK 38 (LXVI)
PRAHA 1993
CS ISSN 0375-8427

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
SLOVENSKÁ AKADÉMIA 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 Veterinar 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

IN VITRO AMPLIFIKÁCIA FRAGMENTU GENÓMU VÍRUSU SLIZNIČNEJ CHOROBY (BVD-MD) PCR METÓDOU

Š. Vilček

Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

Na dôkaz genómu vírusu slizničnej choroby (BVD-MD) hovädzieho dobytku bol vybraný 315 bp úsek z génu kódujúceho vírusový gp 80. Dĺžku amplifikovaného fragmentu vymedzovali priemery P₁-5'-GTAGGTAGAGTGAAACCCGG-3' a P₂-5'-CGGGACCTGGACTTCATAGC-3'. Vírusová RNA bola izolovaná z infekčného média obsahujúceho vírus BVD-MD (kmeň Ph) zmesou fenol-chloroform (1:1). Pred amplifikáciou bola RNA prepísaná do cDNA v prítomnosti P₂ priemeru účinkom AMV reverznej transkriptázy. cDNA bez izolácie z transkripčnej reakčnej zmesi bola priamo použitá do PCR reakcie. Pred začatím amplifikácie bola DNA denaturovaná zahriatím na teplotu 94 °C po dobu 10 minút. Boli zistené tieto vhodné reakčné podmienky PCR metódy: Koncentrácia primerov P₁ a P₂ v 100 µl reakčného roztoku - 1 µM, dNTP - 100 µM, 2 - 4 U *Taq* polymerázy, 25 - 35 cyklov amplifikácie s teplotným režimom: 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 73 °C/1 min, s predĺženou inkubáciou 73 °C/7 min v poslednom cykle. Na dôkaz amplifikovaného produktu - 315 bp DNA - vyhovuje elektroforetická analýza v 1,5 až 2% agarózovom gély v TAE pufri s farbením gélu etídium bromidom.

PCR metóda; vírus slizničnej choroby (BVD-MD); reverzná transkripcia; *in vitro* amplifikácia

Slizničná choroba (BVD-MD) je významné ochorenie hovädzieho dobytku, ktoré sa prejavuje viacerými klinickými príznakmi, napr. hnačkou, v kombinácii s inými patogénmi ako respiračný syndrom, zvýšenou citlivosťou zvierat k rôznym infekciám znížením úžitkovosti (R a d o s t i s t L i t t l e j o h n s , 1988; B a u m a i. , 1989). Intrauterinná infekcia môže viesť k maltransformácii a aborcii plodu (R o s s a i. , 1986). Etiologickým agensom slizničnej choroby je RNA vírus, ktorý patrí medzi pestivírusy. Jeho genóm tvorí jednovláknová RNA o dĺžke približne 12 500 nukleotidov (C o l l e t a i. , 1988).

Laboratórna diagnostika slizničnej choroby je založená predovšetkým na izolácii vírusu na bunkových kultúrach, imunofluorescenčnej detekcii antigénu, detekcii špecifických protilátok vírus-neutralizačným testom, alebo ELISA technikou (D u b o v i , 1990). Uvedené laboratórne vyšetrenie majú z hľadiska diagnostiky niektoré nevýhody, napr. sú časovo zdĺhavé a vyžadujú bunkovú kultiváciu, iné sú nedostatočne citlivé alebo špecifické, pretrvávajú problémy s rozlíšením cytopatických a necytopatických kmeňov vírusu.

S rozvojom techník molekulárnej biológie sa začína aj ďalšia inovácia laboratórnej diagnostiky infekčných chorôb. Najvýznamnejším trendom tejto inovácie je

širšie využívanie molekulárno-genetických metód (P a u l i a i., 1991). Uvedené metódy, na rozdiel od doteraz využívaných, sú založené na detekcii genómov mikroorganizmov vo vyšetrovaných vzorkách. Zvlášť PCR metóda (S a i k i a i., 1985), ktorá umožňuje amplifikovať v *in vitro* podmienkach vybraný úsek genómu mikroorganizmu, pre svoju vysokú citlivosť a špecifitu má perspektívu v laboratórnej detekcii agensov infekčných chorôb. Začiatkom 90. rokov viaceré laboratória využili PCR metódu na detekciu vírusu BVD-MD amplifikovaním vybraných fragmentov jeho genómu (H e r t i g a i., 1991; L o p e z a i., 1991; H o o f t v a n I d d e r k i n g e a i., 1992).

Naše chovy hovädzieho dobytku sú silne premorené infekciou slizničnej choroby. Niektoré vyšetrenia naznačujú, že viac ako 70 % zvierat má v sére špecifické protilátky. Rýchly test na priamy dôkaz vírusu nie je k dispozícii. K riešeniu tohto problému sme pristúpili využitím metód molekulovej biológie. Najprv sme na inováciu detekcie vírusu BVD-MD zvolili dot-blot hybridizáciu so špecifickou DNA sondou (V i l č e k a i., 1992). V tejto práci uvádzame výsledky experimentov získané pri zavádzaní PCR metódy využitej na amplifikáciu vybraného úseku genómu vírusu BVD-MD.

MATERIÁL A METÓDY

IZOLÁCIA VÍRUSOVEJ RNA

K 500 μ l suspenzie vírusu BVD-MD (vakcinačný kmeň Ph, Bioveta Nitra) o titri asi 10^4 TCID₅₀/ml sme pridali 50 μ l 10% SDS a 55 μ l proteinázy K (Serva) o koncentrácii 0,5 mg/ml. Po inkubácii 56 °C/25 min sme RNA izolovali extrakciou so 600 μ l fenol-chloroformu (1:1). Z 500 μ l odobranej vodnej fázy sme RNA vyzrážali pridaním 50 μ l 3M octanu sodného (pH 5,2) a 1 ml 96% chladeného etanolu. Precipitovanú RNA (-20 °C/18 h) sme rozpipetovali po 2 μ l alikvótoch a zmrazili pri -20 °C.

PRIMERY NA REVERZNÚ TRANSKRIPCIU A PCR METÓDU

Na *in vitro* amplifikáciu sme vybrali 315 bp úsek z génu kódujúceho vírusový glykoproteín gp 80. Primery boli pôvodne navrhnuté autormi H e r t i g a i. (1991) a poskytol nám ich dr. Baird (Edinburg): P₁ - 5'-GTAGGTAGAGTGAAACCCGG-3' a P₂ - 5'-CGGGACCTGGACTTCATAGC-3'.

Pri prepise RNA na cDNA sme využili reverznú transkriptázu a P₂ primer.

PREPIS VÍRUSOVEJ RNA NA cDNA

K 2 μ l RNA vírusu BVD-MD sme pridali 5 μ l injekčnej vody a 1 μ l 100 μ M primeru P₂. Roztok sme zohriali na teplotu 65 °C/5 min a rýchle ponorili do ľadu. K denaturovanej RNA sme pridali 5 μ l 10x reakčného pufru pre reverznú transkripciu (1x - 50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotritol, 1 mM EDTA), 1 μ l 10 mM dNTP (Pharmacia) a 1 μ l AMV (avian myeloblastosis virus) reverznej transkriptázy (7500 U/ml - Promega). Roztok sme

doplnili injekčnou vodou na objem 50 μ l a inkubovali pri 37 °C/2 hodiny. Po skončení reakcie sme roztok zmrazili pri -20 °C.

PCR METÓDA

K 10 μ l roztoku odobratého po skončení reverznej transkripcie (bez izolácie DNA fenoláciou) sme postupne pridali po 1 μ l primerov P₁, P₂ (koncentrácia v reakčnom roztoku - 1 μ M), 1 μ l 10 mM dNTP (koncentrácia v reakčnom roztoku - 100 μ M) potom 10 μ l 10x reakčného roztoku pre *Taq* polymerázu (1x - 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 1 mg/ml želatina) a 76 μ l injekčnej vody a na reakčný roztok sme navrstvili 70 μ l parafinového oleja. Roztok v Ependorfovej skúmavke sme inkubovali na 94 °C/10 minút. Potom sme reakčnú zmes vytemperovali na 73 °C a pridali 1 μ l (1-4 U) *Taq* polymerázy (Boehringer Mannheim). *In vitro* amplifikáciu sme previedli ručným premiestňovaním skúmavky do kúpeľov o teplote 94 °C/1 min; 56 °C/1 min; 73 °C/1 min najčastejšie v režime 35 cyklov. V poslednom cykle sme inkubáciu pri 73 °C prdlžili na 7 minút. Pri zisťovaní niektorých závislostí sme menili počet cyklov (15-35), alebo teplotu pre väzbu primerov (50-62 °C).

ELEKTROFORETICKÁ ANALÝZA APLIFIKOVANÉHO PRODUKTU

Ihneď po skončení PCR metódy sme analyzovali fyzikálnu veľkosť amplifikovaného produktu nanesením 10 μ l aplifikačnej zmesi na 1,5% agarózový gél. Elektorforézu sme robili za štandardných podmienok: TAE pufer, 110 V/45 min, farbenie s etídium bromidom (M a n i a t i s a i., 1982). Pozitívnu apmlifikáciu sme detekovali elektroforetickým pásmom o dĺžke 315 bp, ktorý sme kontrolovali oproti markeru pBR 322-Alu I.

VÝSLEDKY

Pred *in vitro* aplifikáciou sa RNA genóm vírusu BVD-MD musí prepísať na DNA. Pri prepise sme pre DNA polymerázovú aktivitu AMV reverznej transkriptázy využili primer P₂. Získaná cDNA nebola izolovaná z reakčnej zmesi, ale priamo použitá na amplifikáciu PCR metódou. Po pridaní oboch primerov, zmesi všetkých štyroch deoxynukleotidtrifosfátov - dNTP a *Taq* polymerázy sme po 35 cykloch amplifikácie zaznamenali pri elektroforetickej analýze jasný pás 315 bp fragmentu DNA (obr. 1c). Spolu s 315 bp pásmom sa po amplifikácii objavuje aj menej výrazný menší fragment (asi pod 100 bp) neznámej povahy, ale tento elektroforetický pás neprekáža dôkazu hlavného produktu amplifikácie. Pri kontrolnej elektroforetickej analýze cDNA vírusu BVD-MD (obr. 1a) a primeru P₂ (obr. 1b) sme nezistili žiadne elektroforetické pásy.

V študovanom intervale teplôt hybridizácie, t.j. väzby (annaeling) primerov (50 - 62 °C) sme po 35 cykloch amplifikácie vždy zistili 315 bp fragment DNA (obr. 2A). So zvyšovaním teploty hybridizácie dochádza k špecifickejšej amplifikácii, čo sa prejavilo čistejším 315 bp elektroforetickým pásmom (bez „chvostovania“). Pre ďalšie experimenty sme zvolili kompromisnú teplotu 56 °C/1 min.

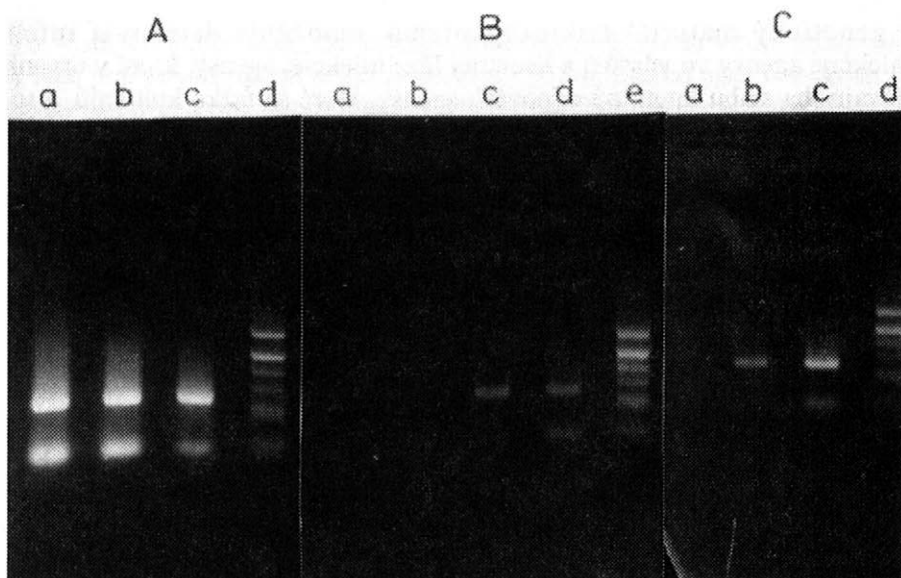


1. Elektroforetický dôkaz 315 bp aplikovaného fragmentu genómu vírusu BVD-MD: a - cDNA vírusu BVD-MD po reverznej transkripcii RNA genómu (koncentrácia 5x vyššia ako v reakčnej zmesi počas *in vitro* amplifikácie); b - primer P₂ (koncentrácia 5x vyššia ako v reakčnej zmesi počas *in vitro* amplifikácie); c - amplifikácia 315 bp fragmentu genómu vírusu BVD-MD, 35 cyklov amplifikácie, teplotný režim: 94 °C/min, 56 °C/1 min, 73 °C/1 min, 4 U *Taq* polymerázy; d - marker pBR 322-Alu I (poloha dôležitých pásov: 910 bp, 659+656 bp, 521 bp, 403 bp, 281 bp, 257 bp a ďalších 9 menších fragmentov. Elektroforéza: 1,5% agaróza v TAE pufri, 110 V/45 min, farbenie s etídiom bromidom; na analýzu bolo naložené 10 % objemu roztoku amplifikovanej zmesi, t.j. 10 µl — Electrophoretic proof of 315 bp of the amplified genome fragment of BVD-MD: a - cDNA of BVD-MD after reverse transcription of RNA genome (fivefold higher concentration than in the reaction mixture in the course of *in-vitro* amplification); b - primer P₂ - (fivefold higher concentration than in the reaction mixture in the course of *in-vitro* amplification); c - amplification of 315 bp of BVD-MD genome fragment, 35 amplification cycles, temperature regime: 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 73 °C/1 min, 4 U *Taq* polymerase; d - pBR 322-Alu I marker (position of important bands: 910 bp, 659+656 bp, 521 bp, 403 bp, 281 bp, 257 bp and nine other smaller fragments. Electrophoresis: 1.5% agarose in TAE buffer, 110 V/45 min, ethidium bromide staining; 10 % of the volume of amplified mixture solution, i.e. 10 µl, were loaded for analysis

Ďalej sme študovali vplyv počtu cyklov amplifikácie a aktivity *Taq* polymerázy na množstvo amplifikovaného produktu. Detekovateľný 315 bp elektroforetický pás sme zistili už po 25 cykloch amplifikácie (obr. 2B, c), pričom tento pás bol jasnejší po 35 cykloch (obr. 2B, d). V snahe zvýšiť citlivosť PCR metódy je výhodné uskutočniť *in vitro* amplifikáciu s 35 cyklami v teplotnom režime 94 °C/1 min; 56 °C/1 min; 73 °C/1 min. Za týchto podmienok je potrebné do reakčného roztoku o objeme 100 µl pridať 2-4 U *Taq* polymerázy (obr. 2C, b, c).

DISKUSIA

PCR metóda, prvýkrát popísaná v polovici 80. rokov (Saiki a i., 1985; Mullis a Fallona, 1987), je založená na princípe *in vitro* amplifikácie, t.j. pomnožení vybraného úseku dvojvláknovej DNA. Dĺžku amplifikovaného úseku DNA vymedzujú krátke syntetické molekuly DNA - primery, ktoré sa naviažu (prihybridizujú) na jeho koncové sekvencie nukleotidov. DNA polymeráza, v súčasnosti najčastejšie *Taq* polymeráza, dosyntetizuje v prítomnosti dNTP nové vlákno DNA, podľa matrice jednovláknovej DNA predĺžovaním 3' - konca primerov. Po ďalšej denaturácii novosyntetizovanej dvojvláknovej DNA sa pri vhodnej teplote opäť naviažu primery a enzým opäť dosyntetizuje nové komplementárne vlákna DNA. Tento proces sa môže mnohokrát opakovať, takže v priebehu *n* cyklov (každý cyklus je zložený z troch krokov: denaturácia - hybridizácia primerov - syntéza DNA) teo-



2. Vplyv teploty hybridizácie primerov (A) počtu cyklov (B) a aktivity *Taq* polymerázy (C) na amplifikáciu 315 bp fragmentu genómu vírusu BVD-MD: A - teplota hybridizácie, t.j. väzby primerov: a - 50 °C, b - 56 °C, c - 62 °C, d - marker pBR 322-Alu I; 35 cyklov amplifikácie: 94 °C/1 min, 50 - 62 °C/1 min, 73 °C/1 min, 4 U *Taq* polymerázy); B - počet cyklov amplifikácie: a - 5, b - 15, c - 25, d - 35, e - marker pBR 322-Alu I; tepelné režimy cyklov: 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 73 °C/1 min, 4 U *Taq* polymerázy; C - aktivita *Taq* polymerázy (Amersham: a - 1 U, b - 2 U, c - 4 U, d - marker pBR 322 Alu I; 35 cyklov amplifikácie: 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 73 °C/1 min. Elektroforéza: 1,5% agaróza v TAE pufri, 110 V/45 min, farbenie s etídiom bromidom; na analýzu bolo naložené 10 % objemu roztoku amplifikovanej zmesi (t.j. 10 µl) — The effect of the temperature of primer hybridization (A), cycle number (B) and *Taq* polymerase activity (C) on 315 bp amplification of BVD-MD genome fragment: A - hybridization temperature, i.e. primer bond: a - 50 °C, b - 56 °C, c - 62 °C, d - pBR 322-Alu I marker; 35 amplification cycles: 94 °C/1 min, 50-62 °C/1 min, 73 °C/1 min, 4 U *Taq* polymerase; B - number of amplification cycles: a - 5, b - 15, c - 25, d - 35, e - pBR 322-Alu I marker; temperature regimes of cycles: 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 73 °C/1 min, 4 U *Taq* polymerase; C - *Taq* polymerase activity (Amersham: a - 1 U, b - 2 U, c - 4 U, d - pBR 322 Alu I marker). 35 amplification cycles: 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 73 °C/min. Electrophoresis: 1.5% agarose in TAE buffer, 11 V/45 min, ethidium bromide staining; 10 % of the volume of amplified mixture solution, i.e. 10 µl, were loaded for analysis

reticky dôjde k 2^n pomnoženiu, t.j. amplifikácii molekúl DNA. V priebehu 20 až 30 cyklov sa DNA v reálnych podmienkach pomnoží asi 10^5 - 10^6 (Lynch a Brown, 1990), z femtogramových množstiev až na mikrogramové množstvá. Molekuly RNA je možné PCR metódou amplifikovať až po ich prepise na DNA. Táto modifikácia PCR metódy bola v literatúre pomenovaná RT-PCR (reverse transcription PCR).

Okrem toho, že PCR metóda našla široké využitie v základnom výskume (Vosberg, 1989) výrazne zasiahla aj do inovácie diagnostiky infekčných chorôb. Dôkaz mikroorganizmu spočívajúci na selektívnom pomnožení vybraného úseku jeho genómu je veľmi citlivý a špecifický. Pretože PCR metóda využíva k dô-

kazu genetický materiál mikroorganizmu, umožňuje detekovať infekčné a neinfekčné agensy vo včasnej a latentnej fáze infekcie, agensy, ktoré v organizme vyvolávajú iba slabú imunitnú odpoveď, agensy, ktoré sa ťažko kultivujú, a to bez potreby živého biologického systému (V i l č e k, 1992). Metodicky jednoduchá PCR metóda silne konkuruje časove zdĺhavej a na bunkovej kultivácii závislej metóde izolácii infekčného agensa. Tieto dôvody viedli viaceré laboratória k overovaniu PCR metódy aj na dôkaz vírusov významných nielen v humánnej, ale aj veterinárnej medicíne, napr.: vírus Aujezského choroby (M a e s a i., 1990), vírus besnoty (E r m i n e a i., 1990), rotavírus (X u a i., 1990), prasačí parvovírus (M o l i t o r a i., 1990), vírus leukózy (M u r t a u g h a i., 1991), vírus slintačky a krívačky (M e y e r a i., 1991), vírus afrického moru ošľpaných (S t e i g e r a i., 1992) a iné.

Na amplifikáciu sme použili najjednoduchší model, infekčné médium obsahujúce vírus BVD-MD (vakcinačný kmeň Ph), dodané v lyofilizovanom stave bez buniek. Prvým krokom bola izolácia vírusového RNA genómu. Z rôznych techník sme použili jednoduchú fenol-chloroformovú metódu. Pretože pri izolácii RNA hrozí riziko jej degradácie účinkom ribonukleáz, do reakčných roztokov sa spravidla pridávajú inhibítory týchto enzýmov (M a n i a t i s a i., 1992) a sklo sa tepelne opracováva. V našom laboratóriu sme pri izolácii RNA vynechali pridávanie drahých inhibítorov a všade, kde to bolo možné, sme použili polyetylénové skúmavky. K zníženiu degradácie RNA na minimum sme RNA rozpúšťali v injekčnej vode, okamžite rozpípetovali do malých objemov a zmrazili pri -20 °C.

Pretože *Taq* polymeráza využíva ako substrát len molekuly DNA, pred amplifikáciou bola izolovaná RNA prepísaná reverznou transkriptázou s využitím primeru P₂, ktorý bol využitý aj pri PCR metóde. Výsledok tejto reakcie nebol priamo kontrolovaný, ale cDNA bola ihneď bez izolácie z transkripčnej reakčnej zmesi priamo použitá ako zložka (amplifikovaná vzorka) PCR metódy.

Podobne ako iné laboratórne techniky aj PCR metóda vyžaduje optimalizáciu reakčných podmienok. Jednou z dôležitých zložiek PCR metódy sú vhodné primery. Na amplifikáciu časti genómu vírusu BVD-MD vybral napr. H e r t i g a i. (1991) primery z génu kódujúceho vírusový p80 polypeptid alebo obalový glykoproteín gp 53, iní autori gén kódujúcu gp 48, holandskí autori H o o f t v a n I d d e n k i n g e a i. (1992) 482 bp úsek z oblasti gp 80 a napr. L o p e z a i. (1991) 205 bp úsek z cDNA vymedzený polohami nukleotidov 9893-10098. Vzhľadom na dostupnosť primerov sme na amplifikáciu vybrali 315 bp úsek vírusového génu kódujúceho polypeptid p80 navrhnutý autormi H e r t i g a i. (1991).

Z literárnych údajov je známe, že genómy cytopatogénnych a necytopatogénnych kmeňov vírusu BVD-MD vykazujú značnú variabilitu (R i d p a t h a B o l i n, 1991), preto sa veľmi ťažko hľadajú univerzálne PCR primery. Úspešná amplifikácia kmeňa Ph naznačuje, že výber primerov z génu kódujúceho gp 80 je perspektívny aj z hľadiska detekcie kmeňov vírusu BVD-MD vyskytujúcich sa v našich chovoch. Žiaľ, vírus slizničnej choroby je často nežiadúca kontaminujúca zložka fetálnych sér, ktoré sa používajú pri kultivácii buniek (L e v i n g s a W e s s m a n, 1991). Do akej miery tento fakt zohral úlohu v našich pokusoch s PCR metódou nie je možné zistiť, lebo vírus BVD-MD sme získali vo forme lyofilizovaného média bez možnosti získať ako kontrolu samotné použité kultivačné médium.

Vo všetkých experimentoch *in vitro* amplifikácie genómu vírusu slizničnej choroby sme pozorovali okrem očakávaného elektroforetického pásu o veľkosti 315 bp aj menší pás o veľkosti okolo 100 bp. Výskyt menšieho pásu je najskôr spôsobený vytváraním nízkomolekulárnych štruktúr primer-dimer, pretože použité primery obsahujú štyri navzájom komplementárne nukleotidy. Tento fakt môže ovplyvniť citlivosť testu a preto paralelne s týmito experimentami overujeme aj vlastnosti ďalších štyroch párov primerov na detekciu genómu vírusu BVD-MD.

Väzba primerov na vzorku DNA závisí na zvolení vhodnej teploty hybridizácie (annealing). Voľba tejto teploty súvisí s nukleotidovým zložením primerov. Podobne ako Hertig a i. (1991), aj my sme zistili, že vhodnou teplotou je kompromisná hodnota 56 °C/1 min. Pri nižšej teplote sa môže objaviť nešpecifická amplifikácia, pri vyššej teplote môže klesať účinnosť amplifikácie. Zmenu teplôt jednotlivých cyklov (94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 73 °C/1 min) sme robili manuálnym premiestňovaním skúmavky do troch vodných kúpeľov. Táto operácia je veľmi monotónna. Zmenu teplôt reakčného prostredia spravidla zabezpečuje automatické programovateľné zariadenie - termocykler. Naše predbežné experimenty s termocyklerom fy Perkin Elmer-Cetus potvrdili, že pri rovnakom teplotnom režime tiež dôjde k úspešnej amplifikácii 315 bp fragmentu BVD-MD.

Kvalita a úspech amplifikácie PCR metódou závisí aj od kvality *Taq* polymerázy. V našich pokusoch bol prevažne použitý termostabilný enzým fy Boehringer Mannheim alebo Amersham a čiastočne aj Perkin Elmer-Cetus, ktorý optimálne pracuje pri teplote 73 °C. Z vlastných skúseností môžeme potvrdiť, že niektoré šarže enzýmu fy Serva nám v PCR reakcii z neznámych príčin zlyhali. Kolísanie kvality *Taq* polymerázy tejto firmy pozorovali aj iní autori (Malý a i., 1992). Množstvo produktu exponenciálne závisí na počte cyklov amplifikácie (Lynch a Brown, 1990). V našich podmienkach sme 315 bp fragment DNA mohli elektroforeticky dokázať po 25 cykloch (2 U *Taq* polymerázy, celkový reakčný objem 100 µl). Pri nezmenenom počte cyklov je možné redukováním reakčného roztoku na polovičný objem znížiť až o 50 % spotrebu vzácnych primerov, enzýmu, dNTP, čo sme aj neskôr potvrdili.

Zavedenie metódy na amplifikáciu fragmentu genómu vírusu BVD-MD PCR metódou je motivovaný vývojom citlivého, špecifického a rýchleho testu na diagnostiku slizničnej choroby hovädzieho dobytku. V tomto štádiu rozpracovania experimentov môžeme konštatovať, že metodika je časovo pomerne krátka: Izolácia RNA fenolovou technikou trvá asi 20 - 30 min, so zrážaním pri -20 °C 1 h, alebo výhodnejšie cez noc. Vzorky RNA môžu byť predpripravené do zásoby a dlhodobo skladované pri -20 °C. Reverzná transkripcia trvá 2 h a následná amplifikácia PCR metódou 2 - 3 h, elektroforeticky dôkaz produktu amplifikácie 1 hodinu. Pokusy určujúce citlivosť a špecifitu nášho amplifikačného systému s využitím ďalších primerov sú v štádiu rozpracovania.

Inovácia diagnostických a detekčných postupov využívaných vo veterinárnej medicíne je náš dlhodobý výskumný zámer. Nedávno sme rozpracovali podmienky detekcie vírusu BHV-1 metódou dot-blot hybridizácie (Vilček a i., 1992) a čiastočne aj PCR metódou (Vilček, 1993). Z našich experimentov tiež vyplýva, že nami navrhnutý syntetický oligonukleotid môže ako DNA sonda v dot-blot

hybridizácii detekovať niektoré kmene vírusu BVD-MD (Vilček a i., 1992). Avšak RT-PCR metóda popisovaná v tejto práci s využitím vhodných primerov umožní kvalitnejšiu detekciu vírusu BVD-MD.

Podakovanie

Ďakujem MVDr. Mariánovi Knapovi za technickú pomoc pri realizácii tejto práce.

Literatúra

BAUM, K. H. - PERRY, B. D. - LESSARD, P. - DUBOVI, E. J. - HUNTER, W. S. - HOOKE, P. L.: Epidemiology of bovine viral diarrhea - mucosal disease in beef cattle. *Com. Cont. Educ. Pract. Veter.*, 11, 1989, s. 1147-1157.

COLLET, M. S. - LARSON, R. - GOLD, C. - STRICK, D. - ANDERSON, D. K. - PURCHIO, A. F.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology*, 165, 1988, s. 191-199.

DUBOVI, E. J.: The diagnosis of bovine viral diarrhea infections: A laboratory view. *Veter. Med.*, Oct. 1990, s. 1133-1139.

ERMINE, A. - LARZUL, D. - CECCALDI, P. E. - GUESDON, J. L. - TSIANG, H.: Polymerase chain reaction amplification of rabies virus nucleic acids from total mouse brain RNA. *Molec. cell. Probe*, 4, 1990, s. 189-191.

HERTIG, C. - PAULI, U. - ZANONI, R. - PETERHANS, E.: Detection of bovine viral diarrhea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. *Veter. Microbiol.*, 26, 1991, s. 65-76.

HOOFT van IDDERKINGE, B. J. L. - Van WAMEL, J. L. B. - Van GENNIP, H. G. P. - MOORMANN, R. J. M.: Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhea virus infections in cattle. *Veter. Microbiol.*, 30, 1992, s. 21-34.

LEVINGS, R. L. - WESSMAN, S. L.: Bovine viral diarrhea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. *Dev. Biol. Standard*, 75, 1991, s. 177-181.

LOPEZ, O. J. - OSORIO, F. A. - DONIS, R. O.: Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by polymerase chain reaction. *J. clin. Microbiol.*, 29, 1991, s. 578-582.

LYNCH, J. R. - BROWN, J. M.: The polymerase chain reaction: current and future clinical applications. *J. med. Genet.*, 27, 1990, s. 2-7.

MAES, R. K. - BEISEL, C. E. - SPATZ, S. J. - THACKER, B. J.: Polymerase chain reaction amplification of pseudorabies virus DNA from acutely and latently infected cells. *Veter. Microbiol.*, 24, 1990, s. 281-295.

MALÝ, P. - BOUBELÍK, M. - DRÁBER, P.: Srovnání účinnosti různých *Taq* polymeráz v PCR. *Imunol. Zprav.*, 7, 1992, s. 51-55.

MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1982.

MEYER, R. F. - BROWN, C. C. - HOUSE, C. - HOUSE, J. A. - MOLITOR, T. W.: Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissue by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. *J. Virol. Meth.*, 34, 1991, s. 161-172.

MOLITOR, T. W. - ORAVEERAKUL, K. - ZHANG, Q. Q. - CHOI, C. S. - LUDEMANN, L. R.: Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. *J. Virol. Meth.*, 32, 1991, s. 201-211.

MULLIS, K. B. - FALOONA, F. A.: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase - catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 155, 1987, s. 335-350.

- MURTAUGH, M. P. - LIN, G. F. - HAGGARD, D. L. - WEBER, A. F. - MEISKE, J. C.: Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.*, 33, 1991, s. 73-85.
- PAULI, U. - ZANONI, R. - HERTIG, C. - PETERHANS, E.: Veterinärmedizin und Molekularbiologie: Möglichkeiten und Grenzen der Virusdetektion. *Schweiz. Arch. Tierheilkde.*, 133, 1991, s. 35-42.
- RADOSTITS, O. M. - LITTLEJOHNS, I. R.: New concepts in the pathogenesis diagnosis and control of diseases caused by the bovine viral diarrhoea virus. *Can. veter. J.*, 29, 1988, s. 513-528.
- RIDPATH, J. F. - BOLIN, S. R.: Hybridization analysis of genomic variability among isolates of bovine viral diarrhoea virus using cDNA probes. *Molec. cell. Probe.*, 5, 1991, s. 291-298.
- ROSS, C. E. - DUBOVI, E. J. - DONIS, R. D.: Herd problem of abortion and malformed calves attributed to bovine diarrhoea. *J. Amer. veter. Med. Assoc.*, 188, 1986, s. 618-619.
- SAIKI, R. K. - SCHARF, S. - FALOONA, F. - MULLIS, B. K. - HORN, G. T. - ERLICH, H. A. - ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1985, s. 1350-1354.
- STEIGER, Y. - ACKERMANN, M. - METTRAUX, C. - KIHLM, U.: Rapid a biologically safe diagnosis of African swine fever virus infection by using polymerase chain reaction. *J. clin. Microbiol.*, 30, 1992, s. 1-8.
- VILČEK, Š.: PCR - metóda *in vitro* amplifikácie DNA. *Biol. listy*, 57, 1992, s. 28-44.
- VILČEK, Š.: Detection of the bovine herpesvirus-1 genome by PCR method. *J. Virol. Meth.*, 41, 1993, s. 245-248.
- VILČEK, Š. - DELIOVÁ, I. - FORGÁČ, O. - TAKÁCSOVÁ, I. - STROJNÝ, L. - BENKO, G.: Využitie molekulárno-genetických metód na detekciu infekčných patogénov zvierat. [Záverečná správa.] Košice, Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny 1992.
- VOSBERG, H. P.: The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum. Genet.*, 83, 1989, s. 1-15.
- XU, L. - HARBOUR, D. - McCRAE, M. A.: The application of polymerase chain reaction to the detection of rotavirus in faeces. *J. Virol. Meth.*, 27, 1990, s. 29-38.

Došlo 31. 8. 1992

VILČEK, Š. (University of Veterinary Medicine, Košice):

***In-vitro* amplification of genome fragment of bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD) by PCR method.**

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (5) : 257-266.

DNA *in-vitro* amplification when a PCR (polymerase chain reaction) method is used (S a i k i et al., 1985) provides for a simple technique of marked amplification of a selected DNA fragment. The length of a DNA amplified fragment is determined by two synthetic primers which spontaneously (at an appropriate temperature) hybridize with the opposite ends of antiparallely oriented strains of denatured DNA. The enzyme *Taq* polymerase completes the synthesis of new DNA strains from the primers. Repetition of these cycles (denaturing, primer bonds, DNA synthesis) enhances the DNA amplification of a defined strain length to such an extent that is possible to prove this process by e.g. electrophoretic analysis.

For the purposes of a proof of BVD-MD genome in cattle the fragment 315 bp was chosen from the virus-coding gene gp 80. The primers P₁ - 5'-GTAGGTAGAGTGAAACCCGG - 3' and P₂ - 5'-CGGGACCTGGACTTCATAGC - 3' (H e r t i g et al., 1991) determined

the length of the amplified fragment. Virus RNA was isolated from the infectious BVD-MD-containing medium (Ph strain) using a phenol-chloroform (1:1) mixture, and before amplification it was transcribed to cDNA in the P₂ presence by the effect of AMV reverse transcriptase. cDNA without isolation from the transcription reaction mixture was directly used for PCR. DNA was denatured at 94 °C for 10 minutes before the outset of amplification. These reaction conditions are suitable for the PCR method: P₁ and P₂ primer concentrations per 100 µl reaction solution - 1 µM, dNTP - 100 µM, 2 - 4 U *Taq* polymerase, 25 - 35 amplification cycles with the temperature regime: 94 °C/1 min, 56 °C/1 min, 73 °C/1 min, and prolonged incubation 73 °C/7 min in the last cycle. Proof of the amplified product 315 bp DNA - electrophoretic analysis of 1.5 to 2% agarose gel in TAE buffer and ethidium bromide staining of gel are suitable.

The introduced PCR method gives opportunities for innovations of BVD-MD diagnosis in cattle on the basis of virus genome proof without any cell cultivation need.

PCR method; BVD-MD; reverse transcription; *in-vitro* amplification

Contact Address:

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

ANTAGONISTICKÁ AKTIVITA BACHOROVÝCH BAKTÉRIÍ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* A *STAPHYLOCOCCUS WARNERI*

A. Lauková

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

Bachorové kmene *E. faecium* (5) a *S. warneri* (4) boli testované na antagonistickú aktivitu resp. antimikrobiálne spektrum bacteriocin-like substancií produkovaných týmito baktériami. Ako indikátorové kmene boli použité izoláty bachorového i nebachorového pôvodu. Všetky izoláty produkovali bacteriocin-like substancie inhibujúce rast aspoň jedného zo série 9 indikátorových kmeňov pri prevahe jasných inhibičných zón o veľkosti 2-10 mm. Všeobecne, testované kmene inhibovali rast ako gram-pozitívnych, tak aj gram-negatívnych baktérií, avšak stafylokoky prejavili antagonistickú aktivitu s menším antimikrobiálnym spektrom v porovnaní s enterokokmi. Predĺženie kultivačnej doby neovplyvnilo antagonistickú aktivitu testovaných kmeňov. Teplota 60 °C (30 min) a ošetrovanie trypsínom spôsobili u väčšiny testovaných kmeňov stratu inhibičnej aktivity, zatiaľčo inhibičná aktivita bola zachovaná u väčšiny kmeňov po ošetrovaní enzýmom pronáza P.

Enterococcus faecium; *Staphylococcus warneri*; antagonistická aktivita; bacteriocin-like substancia; antimikrobiálne spektrum; teplota; enzýmy

Stafylokoky a enterokoky patria ku prvým kyselinu mliečnu produkujúcim baktériám v bachorovom mikrobiálnom ekosystéme mláďat prežúvavcov (Barr a i., 1980). Enterokoky (laktobacily nevynímajúc) sú dokonca jej hlavnými producentami v prvom týždni života teliat (Kmet a i., 1990). U prežúvavcov sa kyselinu mliečnu produkujúce baktérie aktívne zúčastňujú intermediárneho metabolizmu (Lauková a Kuncová, 1991). Kyselinu mliečnu produkujúce baktérie sú taktiež producentami heterogénnej skupiny jednoduchých proteínov ako aj polypeptidov s rôznym zložením aminokyselín, ktoré sa vyznačujú rôznymi chemickými či fyzikálnymi vlastnosťami, molekulovými hmotnosťami ako aj antimikrobiálnym spektrom účinku - bacteriocínov resp. lantibiotík (Schillinger, 1990). Boli publikované už viaceré práce predstavujúce gram-pozitívne baktérie ako producentov bacteriocínov či lantibiotík (Tagg a i., 1976; Kaletta a i., 1989; Parrot, 1990), avšak prezentované izoláty boli zväčša humánneho alebo nutričného pôvodu.

Cieľom tejto práce bolo sledovať antagonistickú aktivitu bachorových druhov *E. faecium* a *S. warneri*, ktoré sú najčastejšími zástupcami svojich bakteriálnych skupín v bachore mladých prežúvavcov (Lauková, 1992a, b).

MATERIÁL A METÓDA

Kmene *E. faecium* (5) boli izolované z bachorového obsahu teliat a kmene *S. warneri* SW24, SW34, SW48 boli izolované z bachorového obsahu jahniat

a kmeň SW98 bol izolovaný z bachorovej steny jahniat. Na záchyt druhov *E. faecium* bol použitý Selektívny bujón pre fekálne streptokoky (Imuna, Šarišské Michaľany) s prídavkom 60 g chloridu sodného, 18 g agaru a 10 % defibrinovanej baranej krvi. Kmene *S. warneri* boli selektované na manitolovom médiu s obsahom 2 ml hovädzieho koncentrovaného odvaru, 10 g peptónu, 10 g manitolu, 75 g chloridu sodného, 25 ml fenolovej červene a 18 g agaru. Izoláty boli diagnostikované ako druhy *E. faecium* a *S. warneri* na základe výsledkov použitého identifikačného systému Strepto- resp. Staphy-test (Lachema, Brno) ako aj podľa autorov Kloos a Schleifer (1975), Schleifer a Kilpper-Bälz (1984) a Ruoff (1990).

Antagonistická aktivita (bacteriocin-like produktivita) bola testovaná metódou podľa autorov Skalka a i. (1983), pričom bola sledovaná veľkosť (mm) a jasnosť inhibičných zón. Ako indikátorové baktérie boli použité bachorové kmene *Streptococcus bovis* A024/85 (Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice), *Lactobacillus plantarum* L53 (už uvedené pracovisko), *Enterococcus faecium* A26 a *Staphylococcus sp.* ST20 (ÚFHZ SAV, Košice), ale tiež kmene rôzneho pôvodu ako *Staphylococcus aureus* Oxford 209 P, *Corynebacterium renale* CCM 5740 (VŠV, Brno), *Providentia stuartii* J.H.1. (Detská nemocnica Toronto, Kanada) a *Escherichia coli* EC7 (ÚFHZ SAV, Košice) — tab. I. Pozitívnu bakteriocín produkujúcou kontrolou boli kmene *S. aureus* ČB 44 (VŠV, Brno) a *E. faecium* AL6 (vlastný izolát).

Citlivosť produkovaných bacteriocin-like substancií na teplotu 60 °C (30 min) bola sledovaná podľa autorov Lyon a Glatz (1991), pričom boli vzorky po teplotnej expozícii testované na pretrvávajúcu aktivitu.

Citlivosť bacteriocin-like substancií na ošetrovanie trypsínom a pronázou P bola stanovená metódou podľa Tobu a i. (1991). Trypsín (Serva, Germany) a pronáza P (Sigma, USA) boli do vzoriek pridané v konečnej koncentrácii 0,5 mg/ml. Vzorky s enzýmami ako aj bez ich prídavkov boli inkubované 1 h pri teplote 37 °C a potom testované na pretrvávajúcu aktivitu. Reprodukateľné výsledky boli získané po trojnásobnom opakovaní testovania.

VÝSLEDKY

Všetky izoláty (okrem SW48 a EF24c v prípade indikátorov bachorového pôvodu) produkovali bacteriocin-like substancie inhibujúce rast aspoň jedného zo série 9 použitých indikátorových kmeňov. Pri posudzovaní inhibičných zón z morfológického hľadiska prevládali jasné zóny inhibície so zaoblenými okrajmi o veľkosti 2 - 10 mm (tab. II, III). U testovaných enterokokov bol intenzívnejšie inhibovaný rast nebachorových indikátorov v porovnaní s indikátormi bachorového pôvodu, avšak prevládali inhibičné zóny vo veľkosti (šírka) 2 - 5 mm. Všeobecne, stafylokoky prejavili antagonistickú aktivitu s menším antimikrobiálnym spektrom v porovnaní s enterokokmi. Všetky kmene, vynímajúc *S. warneri* SW48, inhibovali rast indikátora 209 P. Rast indikátora *E. coli* EC7 inhibovali všetky testované enterokoky. Ani jeden z testovaných kmeňov neinhiboval rast indikátorovej baktérie *E. faecium* A26.

I. Indikátorové baktérie použité pri testovaní antagonistickej aktivity — Indicator bacteria used in the tests of antagonistic activity

Druh ¹	Zdroj ²
Rôzne izoláty ³	
Gram-pozitívne kmene ⁴ <i>Staphylococcus aureus</i> Oxford 209P	klinický izolát ⁷
<i>Corynebacterium renale</i> CCM 5740	klinický izolát ⁷
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCM 467	mliečny izolát ⁸
Gram-negatívne kmene ⁵ <i>Escherichia coli</i> EC7	kurča-slepé črevo ⁹
<i>Providentia stuartii</i> J.H.1.	klinický izolát ⁷
Bachorové izoláty ⁶	
<i>Streptococcus bovis</i> A024/85	bachor-teľa ¹⁰
<i>Staphylococcus</i> sp. ST20	bachor-teľa ¹⁰
<i>Enterococcus faecium</i> A26	bachor-teľa ¹⁰
<i>Lactobacillus plantarum</i> L53	bachor-teľa ¹⁰

¹species, ²source, ³different isolates, ⁴gram-positive strains, ⁵gram-negative strains, ⁶rumen isolates, ⁷clinical isolate, ⁸lactic isolate, ⁹caecum-chick, ¹⁰rumen-calf

II. Antimikrobiálne spektrum bacteriocin-like substancií produkovaných bachorovými izolátmi *E. faecium* a *S. warneri* — Antimicrobial spectrum of bacteriocin-like substances produced by the rumen isolates *E. faecium* and *S. warneri*

Testované kmene ¹	Indikátorové baktérie bachorového pôvodu ²		
	Veľkosť inhibičných zón (mm) ³		
	AO24/85 ⁴	ST20 ⁵	L53 ⁶
<i>Staphylococcus warneri</i> SW24c	-	-	-
SW34	+	+	+
SW98	+	+	+
<i>Enterococcus faecium</i> EF35	+	-	-
EF26/142	+	-	-
EF24/232	+	+	-
EF61	-	+	-

Ani jeden z testovaných kmeňov neinhiboval rast indikátora *E. faecium* A26 — None of the tested strains inhibited the growth of the indicator *E. faecium* A26

Kmene SW48 a EF24c boli bez antagonistickej aktivity pri použití bachorových indikátorov — SW48 and EF24c strains were without antagonistic activity using indicators of rumen origin

+ = veľkosť inhibičnej zóny 2 - 5 mm — diameter of the zone of inhibition 2 - 5 mm

- = žiadna inhibičná zóna — no inhibition zone

¹tested strains, ²indicator bacteria - rumen isolates, ³diameter of the zones of inhibition (mm),

⁴*Streptococcus bovis*, ⁵*Staphylococcus* sp., ⁶*Lactobacillus plantarum*

III. Antimikrobiálne spektrum bacteriocin-like substancií produkovaných bachorovými izolátmi *E. faecium* a *S. warneri* — Antimicrobial spectrum of bacteriocin-like substances produced by rumen isolates *E. faecium* and *S. warneri*

Testované kmene ¹	Indikátorové baktérie rôzneho pôvodu ²				
	Veľkosť inhibičných zón (mm) ³				
	Oxford 209P ⁴	CCM 5740 ⁵	CCM 467 ⁶	EC7 ⁷	J.H.1. ⁸
<i>Staphylococcus warneri</i> SW24	+	+	-	-	+
SW34	+	-	-	-	+
SW98	+	+	-	-	+
SW48	-	-	-	-	+
<i>Enterococcus faecium</i> EF35	+	+	+	+	+
EF26/142	+	ND	-	+	+
EF24/232	+	+	-	++	+
EF61	++	+	-	++	-
EF24c	+	+	-	+	-

SW24, SW34, SW48 = kmene izolované z bachorového obsahu jahniat — strains isolated from the rumen contents of lambs

SW98 = izolát z bachorovej steny jahniat — isolate from the rumen wall of lambs

EF - kmene izolované z bachorového obsahu teliat — strains isolated from the rumen contents of calves

+

++ = veľkosť inhibičnej zóny 5 - 10 mm — diameter of the zone of inhibition 5 - 10 mm

- = žiadna inhibičná zóna — no inhibition zone

ND = not determined

¹ tested strains, ² indicator bacteria of non-rumen origin, ³ diameter of inhibition zones (mm),

⁴ *Staphylococcus aureus*, ⁵ *Corynebacterium renale*, ⁶ *Lactobacillus acidophilus*, ⁷ *Escherichia coli*,

⁸ *Providentia stuartii*

Indikátor *L. plantarum* L53 bol inhibovaný len bacteriocin-like substanciou produkovanou kmeňom SW34. Predĺženie kultivačnej doby neovplyvnilo antagonistickú aktivitu testovaných kmeňov. Celkove bol inhibovaný rast ako gram-pozitívnych, tak aj gram-negatívnych baktérií.

U kmeňov EF35, SW34 a SW98 bola antagonistická aktivita zachovaná po ošetrovaní trypsínom. U ostatných kmeňov však toto ošetrovanie spôsobilo stratu antagonistickej aktivity. Pri použití pronázy P došlo ku strate aktivity u kmeňov SW24, EF35 a EF26/142. U ostatných testovaných izolátov nespôsobil účinok pronázy P stratu aktivity (tab. IV).

Teplota 60 °C (30 min) nespôsobila stratu inhibičnej aktivity len u kmeňov EF35, EF24/232 a EF24c (tab. IV).

IV. Účinek tepla a enzymů na antagonistickou aktivitu bacteriocin-like substancí produkovaných bachorovými izoláty *E. faecium* a *S. warneri* — The effect of heat and enzyme treatment on the antagonistic activity of bacteriocin-like substances produced by the rumen isolates *E. faecium* and *S. warneri*

Testované kmene ¹	60 °C ^a	Trypsín ^b	Pronáza P ^c
<i>Staphylococcus warneri</i> SW24	S	S	S
SW34	S	R	R
SW98	S	R	R
SW48	S	S	R
<i>Enterococcus faecium</i> EF35	R	R	S
EF26/142	S	S	S
EF24/232	R	S	R
EF61	S	S	R
EF24c	R	S	R

S = strata antagonistické aktivity — loss of antagonistic activity

R = zachovaná antagonistická aktivita — presence of antagonistic activity

a = 60 °C (30 min)

b, c = enzymy pridané v koncentrácii 0,5 mg/ml — concentration of trypsin and pronase P was 0.5 mg/ml

¹ tested strains

DISKUSIA

S. warneri SW24 a SW48 produkovali bacteriocin-like substancie termolabilné pri teplote 60 °C, a zároveň trypsin-senzitívne, čo poukazuje na nízkomolekulárne bakteriocíny na základe klasifikácie bakteriocínov podľa Bradleyho (1976). Bacteriocin-like substancie produkované kmeňmi *S. warneri* SW34 a SW98 sa prejavili ako trypsin-rezistentné a teplo-senzitívne, čo poukazuje podľa Bradleyho klasifikácie na vysokomolekulárne bakteriocíny. Avšak presná diferenciácia týchto substancí si vyžaduje podrobnú analýzu sekvencie aminokyselín v ich peptidovom reťazci, keďže u niektorých stafylokokových druhov (*S. gallinarum* F16/P57 alebo Tü 3928, *S. epidermidis* 5) boli purifikované bakteriocínové substancie s obsahom aminokyselín lahtionin a methyllanthionin, tzv. lantibiotiká (Sahl a Brandis, 1981; Keller, 1988). Bacteriocin-like substancie produkované kmeňmi *E. faecium* EF24c a EF24/232 sú pravdepodobne nízkomolekulárne resp. je možné zaradiť ich do tejto skupiny bakteriocínov, keďže sa prejavili ako trypsin-senzitívne a teplo-rezistentné. Kmene *E. faecium* EF26/142 a EF61 produkovali síce trypsin-senzitívne, avšak zároveň tiež teplo-senzitívne bacteriocin-like substancie, čo poukazuje skôr na nízkomolekulárne substancie resp. bakteriocíny. U kmeňa *E. faecium* EF35 je možné uvažovať o produkcii vysokomolekulárneho bakteriocínu, pretože ním produkovaná substancia sa javila ako trypsin-rezistentná aj keď zároveň teplo-re-

zistentná. Avšak i u týchto kmeňov je potrebná pre užšiu špecifikáciu sekvenčná analýza purifikovaných substancií. Z hľadiska molekulárnej genetiky, možnosti ako využiť získané poznatky pre ďalšie experimenty, poskytujú údaje o plazmidovej determinácii bakteriocínov u niektorých stafylokokov a enterokokov (Colmar a Horaud, 1987; Archer a Scott, 1991; Libertin a i., 1991). Z praktického hľadiska je zas dôležitá možnosť výberu niektorých producentov pre aplikačné použitie. Príkladom je bachorový kmeň *E. faecium* CCM 4231 v preparáte Inhicol na základe silnej bakteriocínovej produkcie určený na potlačanie enteritíd u mladých prežúvavcov, prasiat a kurčiat (Kmeť a i., 1992). Inhibičné účinky bakteriocínov produkovaných kyselinu mliečnu produkujúcimi baktériami sú tiež v súčasnosti využívané v potravinárskom priemysle na potlačanie patogénnych zárodkov (Okereke a Montville, 1991). Dokonca enteropatogény z hydiny perzistujúce v ľudskom čreve boli potláčané bakteriocínmi produkovanými laktobacilmi a pediokokmi (Juven a i., 1991), čo poukazuje na rozsiahle možnosti ich uplatnenia nielen z hľadiska veterinárnej medicíny.

L i t e r a t ú r a

- ARCHER, G. L. - SCOTT, J.: Conjugative transfer genes in staphylococcal isolates from the United States. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 12, 1991, s. 2500-2504.
- BARR, M. E. - MANN, S. O. - RICHARDSON, A. J. - STEWART, C. S. - WALLACE, R.: Establishment of ureolytic staphylococci in the rumen of gnotobiotic lambs. *J. appl. Bacteriol.*, 49, 1980, s. 325-330.
- BRADLEY, D. E.: Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocines. *Bacteriol. Rev.*, 31, 1967, s. 230-314.
- COLMAR, I. - HORAUD, T.: *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmids belong to the same incompatibility group. *Appl. Environ. Microbiol.*, 3, 1987, s. 567-570.
- JUVEN, B. J. - MEINERSMANN, R. J. - STERN, N. J.: Antagonistic effect of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonisation by human enteropathogens in live poultry. *J. appl. Microbiol.*, 70, 1991, s. 95-103.
- KALETTA, C. - ENTIAN, K. D. - KELLNER, R. - JUNG, G. - REIS, M. - SAHL, H. G.: Pep 5, a new lanthibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence. *Arch. Microbiol.*, 152, 1989, s. 16-19.
- KELLNER, R. - JUNG, G. - HÖRNER, T. - ZÄHNER, H. - SCHNELL, N. - ENTIAN, K. D. - GÖTZ, F.: Gallidermin: a new lanthionin containing polypeptide antibiotic. *Eur. J. Biochem.*, 177, 1988, s. 53-59.
- KLOOS, W. E. - SCHLEIFER, K. H.: Isolation and characterization of staphylococci from human skin II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus homini* and *Staphylococcus simulans*. *Int. J. System. Bacteriol.*, 25, 1975, s. 62-79.
- KMEŤ, V. - BALAŠČÁK, J. - DRAVECKÝ, T. - KONIAROVÁ, I. - NEMCOVÁ, R.: Možnosti využitia probiotík v prevencii nekrotickej enteritídy u kurčiat. *Veterinářství*, 8, 1992, s. 307-308.
- KMEŤ, V. - KALAČNÍK, G. I. - BARAN, M.: Oplyvňovanie bachorového ekosystému teliat a jahniat mikrobiálnymi preparátmi. Bratislava, Veda 1990.
- LAUKOVÁ, A.: Biochemické a fyziologické vlastnosti enterokokov izolovaných z bachora teliat. *Živoč. Výr.*, 10, 1992a, s. 857-860.
- LAUKOVÁ, A.: Vlastnosti adherentných stafylokokov izolovaných z bachorovej steny jahniat. *Vet. Med.-Czech.*, 38, 1993, s. 107-113.

- LAUKOVÁ, A. - KUNCOVÁ, M.: Produkcia kyseliny mliečnej a ureázová aktivita u bachorových kmeňov *Enterococcus faecium* a ich genetická stabilita. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991, s. 335-340.
- LIBERTIN, C. R. - DUMITRU, R. - STEIN, D. S.: The hemolysin-bacteriocin produced by enterococci is a marker of pathogenicity. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 15, 1989, s. 115-120.
- LYON, W. J. - GLATZ, B. A.: Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 3, 1991, s. 701-706.
- OKEREKE, A. - MONTVILLE, T. J.: Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. *J. Food Protect.*, 5, 1991, s. 349-353.
- PARROT, M.: Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. *Can. J. Microbiol.*, 36, 1990, s. 123-130.
- RUOFF, K. L.: Recent taxonomic changes in the genus *Enterococcus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1990, s. 75-79.
- SAHL, H. G. - BRANDIS, H.: Production, purification and chemical properties of an antistaphylococcal agent produced by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Gen. Microbiol.*, 127, 1981, s. 377-384.
- SCHLEIFER, K. H. - KILPPER-BÄLZ, R.: Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bact.*, 34, 1984, s. 31-34.
- SCHILLINGER, U.: Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: BILLS, D. D. - KUNG, S. (eds): *Biotechnology and food safety*. 1990, s. 55-74.
- SKALKA, B. - PILICH, J. - POSPIŠIL, L.: Further observations on *Corynebacterium renale* as an indicator organism in the detection of exfoliation-positive bacterial strains of *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakt. Hyg., R.A.*, 256, 1983, s. 168-174.
- TAGG, J. R. - DAJANI, A. S. - WANNAMAKER, L. W.: Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 3, 1976, s. 722-756.
- TOBA, T. - YOSHIOKA, E. - ITOH, T.: Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis*. *Lett. appl. Microbiol.*, 12, 1991, s. 43-45.

Došlo 18. 11. 1992

LAUKOVÁ, A. (Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice):
Antagonistic activities of the rumen bacteria *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus warneri*.
Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (5) : 267-274.

The bacterial strains *E. faecium* and *S. warneri* were tested for their antagonistic activities, and/or for the antimicrobial spectrum of bacteriocin-like substances produced by these bacteria. Isolates of rumen and non-rumen origin were used as indicator strains (Tab. I). All the isolates (except the strains SW48 and EF24c as indicators of rumen origin) produced bacteriocin-like substances inhibiting the growth of at least one of the series of the nine indicators used while clear inhibition zones 2 - 10 mm prevailed (Tabs. II, III). Among the enterococci, the inhibition of non-rumen indicators was more intensive in comparison with the indicators of rumen origin, but the inhibition zones were only 2 - 5 mm. In general, the staphylococci showed the antagonistic activity with the lower antimicrobial spectrum in comparison with the enterococci. None of the tested strains inhibited the growth of the indicator *E. faecium* A26. The summary results show that the growth of both gram-positive and gram-negative bacteria was inhibited. The prolonged cultivation time did not influence the antagonistic activity of the tested strains. In the strains EF35, SW34 and SW98, the antagonistic activity was maintained after

trypsin treatment. But in the other strains, this treatment led to the loss of the antagonistic activity. The use of pronase P resulted in the loss of the activity in the strains SW24, EF35 and EF26/142. The use of pronase P did not lead to the loss of the activity in the other tested isolates (Tab. IV). The temperature of 60 °C did not induce the loss of the inhibition activity only in the strains EF 35, EF24/232 and EF24c (Tab. IV). The specification of the bacteriocin-like substances produced by the tested strains to the group of low or high molecular bacteriocins requires a detailed analysis of amino acids in the peptide chain of these substances after their purification.

Enterococcus faecium; *Staphylococcus warneri*; antagonistic activity; bacteriocin-like substance; antimicrobial spectrum; temperature; enzymes

Contact Address:

MVDr. Andrea Lauková, Ústav fyziologie hospodářských zvířat SAV, Palackého 12,
040 01 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 36251, fax 095 24491

STIMULÁCIA BACHOROVEJ FERMENTÁCIE CICAJÚCICH JAHNIAT

A. Bomba¹, R. Žitňan², I. Koniarová¹, M. Stachová¹, L. Kolodzieyski³,
J. Feješ⁴, J. Lenárt⁴

¹Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice

²Výskumný ústav živočíšnej výroby, Nitra

³Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

⁴Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

Sledovali sme vplyv aplikácie prípravku obsahujúceho živiny a rastové faktory pre bachorové baktérie na úroveň bachorovej fermentácie cicajúcich jahniat. Preparát bol podávaný jahňatám vo veku od 1 do 6 týždňov perorálne, v dávke 1,5 g pre jahňa a deň. Obe skupiny jahniat okrem materinského mlieka dostávali jadrovú krmnú zmes a mali voľný prístup k senu a vode. Vo veku 1, 4, 6 a 10 týždňov boli odporazené vždy po dve jahňatá z pokusnej a kontrolnej skupiny. U jahniat pokusnej skupiny sme zistili vyššie zastúpenie kyseliny propiónovej a valérovej v bachorovej tekutine s najväčšími rozdielmi vo veku 10 týždňov (kyselina propiónová u pokusných jahniat 21,5 mol %, u kontrolnej skupiny 16,3 mol % a kyselina valérová 1,91 mol % oproti 0,85 mol %). Energetická výťažnosť produkcie unikavých mastných kyselín v bachore bola vyššia a pomer acetát : propionát bol nižší u jahniat pokusnej skupiny. Aktivita alfa-amylázy bachorovej tekutiny (E.C. 3.2.1.1.) pokusných jahniat bola vyššia v priebehu celého sledovaného obdobia so signifikantným rozdielom ($p < 0,05$) vo veku 10 týždňov. Aktivita alfa-amylázy mikroflóry adherovanej na bachorový epitel pokusných jahniat dosiahla vo veku 6 týždňov trojnásobok hodnôt kontrolnej skupiny (2,71 nkat/cm² pokusná a 0,86 nkat/cm kontrolná skupina). Počty amylolytických baktérií, streptokokov a laktobacilov v bachorovom obsahu i adherovaných na bachorový epitel boli signifikantne vyššie u pokusných jahniat. Rastrovacou elektrónovou mikroskopiou sme zistili zjavne lepšie vyvinuté papily bachorového epitelu jahniat pokusnej skupiny. Priemerné denné prírastky hmotnosti za celé sledované obdobie dosiahli v pokusnej skupine 0,208 kg a v kontrolnej skupine 0,184 kg. Uvedené výsledky dokladajú pozitívny vplyv prípravku s obsahom živín a rastových faktorov pre bachorové baktérie na úroveň bachorovej fermentácie cicajúcich jahniat.

jahňatá; stimulačný prípravok; bachorová fermentácia

Bachorová fermentácia je komplexným systémom interakčných procesov mikroflóry, krmiva a makroorganizmu. Optimalizácia bachorového trávenia manipuláciou tohto systému by mala byť založená na dôkladných poznatkoch účinkov manipulácie na vzájomné vzťahy jeho jednotlivých komponentov (D e m e y e r a i., 1986). Pre stimuláciu bachorového typu trávenia majú osobitný význam bachorový epitel a mikroflóra bachora.

Rozvoj epitelu bachora možno ovplyvňovať predovšetkým včasným skrmovaním suchých krmív (Hutjens, 1985; Cruywagen a Horn, 1985; Klein a i., 1987), pričom rozvíjajúca sa mikroflóra produkuje bachorovou fermentáciou unikavé masné kyseliny (UMK), ktoré sú chemickým stimulom rozvoja bachorového epitelu (Holub a i., 1969; Williams a i., 1987). Rýchlosť rastu bachorových papíl závisí od množstva tvoriacich sa UMK (Orskov, 1985). Vývoj bachorovej mikroflóry možno podporiť mikrobiálnymi preparátmi, predovšetkým v období začiatku podávania suchých krmív (Kmeť a i., 1984). Efektívne použitie mikrobiálnych preparátov u mláďat je závislé aj od úrovne poznania tzv. ekologických faktorov v bachore, ktoré určujú, v akom veku môže ten ktorý mikroorganizmus kolonizovať bachor a umožniť rozvoj celulolytickej mikroflóry (Fonty a i., 1983). V našej praxi sa používajú mikrobiálne preparáty obsahujúce živé, lyofilizované baktérie. Ich nevýhodou je pomerne krátka expiračná doba.

Cieľom našej práce bolo ovplyvniť úroveň bachorovej fermentácie cicajúcich jahniat aplikáciou prípravku obsahujúceho živiny a rastové faktory pre bachorové baktérie.

MATERIÁL A METÓDA

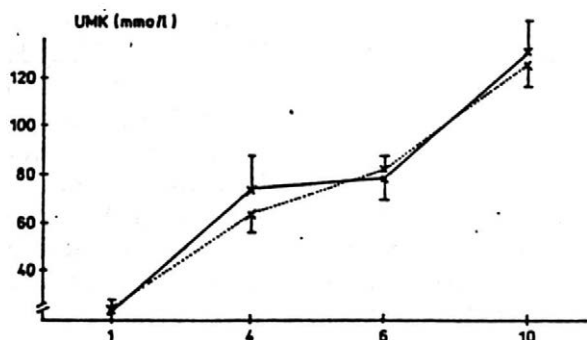
Do experimentu bolo zaradených 20 cicajúcich jahniat s bahnicami, plemena zošľachtená valaška. Zvieratá boli ustajnené skupinovo, v dvoch skupinách po 10 jedincov. Jahňatá prijímali materinské mlieko *ad libitum*. Vo veku od 1 do 3 týždňov dostávali jahňatá oboch skupín preštartér ČOJ 1 v dávkach: 2. týždeň života 0,01 kg a 3. týždeň 0,05 kg na jahňa a deň. Obsah živín v preštartéri ČOJ 1: NL 25,2 %; SNL 22,9 %; vláknina 5,4 %; ŠJ 0,713; NEK 321,2. Od veku 3 týždne do konca sledovaného obdobia dostávali jahňatá doplnkovú zmes pre skorý odstav jahniat štartér ČOJ 2 v dávkach: v 4. týždni života 0,1 kg, v 5. a 6. týždni 0,15 kg, v 7. a 8. týždni 0,2 kg, v 9. a 10. týždni života 0,25 kg na jahňa a deň. Obsah živín v štartéri ČOJ 2: NL 20,4 %; SNL 17,7 %; vláknina 6,5 %; ŠJ 0,685; NEK 258,4. Jahňatá v oboch skupinách mali voľný prístup k senu a vode. Pokusnej skupine jahniat sme aplikovali prípravok na stimuláciu bachorovej fermentácie, ktorý obsahoval: sušené odstredené mlieko 31 %, živný bujón č. 1 (Imuna, Šarišské Michaľany) 20 %, glukóza 20 %, kyselina askorbová 13 %, pečeňový hydrolyzát (Imuna) 8 %, enzýmový kazeinový hydrolyzát (Imuna) 4 %, sójový peptón (Imuna) 4 %. Prípravok bol sterilizovaný a lyofilizovaný. Pri jeho laboratórnej testácii bol zistený pozitívny nárast bakteriálnych kmeňov *Streptococcus bovis* a *Lactobacillus cellobiosus*. Prípravok bol aplikovaný jahňatám v pokusnej skupine denne vo veku od 8. do 42. dňa. Jahňatá dostávali prípravok individuálne *per os* v dávke 1,5 g pre jahňa a deň. Vo veku 1, 4, 6 a 10 týždňov sme z každej skupiny odporazili po 2 jahňatá, 3 - 4 hodiny po nakŕmení. Boli odobraté vzorky bachorovej tekutiny a bachorovej steny z dorzálného bachorového vaku. Vzorky bachorovej steny na stanovenie aktivity alfa-amylázy boli uložené do NTS-flaše s obsahom 50 ml fyziologického roztoku. Ihneď po odbere boli vzorky bachorovej steny zhomogenizované homogenizátorom po dobu 1 min pri 7000 otáčkach. Po homogenizácii boli vzorky centrifugované pri 5000 otáčkach po dobu 4 minút. Pre analýzy bol použitý

supernatant. Vzorky bachorovej steny na rastrovaciu elektrónovú mikroskopiu sa premyli v kakodylanovom pufri a okamžite fixovali v zmesi 2% paraformaldehydu a 2,5% glutaraldehydu v kakodylanovom pufri. Pri odvodnení alkoholovou radou s absolútnym acetónom sa vzorky vysušili kritickým bodom tekutého kyslíčnika uhličitého a pokovili zlatom o hrúbke 20 nm pri teplote 4 °C. Vzorky boli pozorované elektrónovým mikroskopom JEM 100 CX II firmy JOEL s ASID 4D rastrovacím prídavným zariadením pri urýchľovacom napätí 40 kV. Unikavé masné kyseliny boli stanovené metódou plynovej chromatografie na prístroji Hewlett Packard (USA) na kolóne 10 % SP + 1 % H₃PO₄ na chromosorb W. Energetická výťažnosť produkcie UMK bola stanovená metódou podľa autorov O r s k o v a i. (1968). Na stanovenie alfa-amylázy (E.C. 3.2.1.1.) sme použili Spofa-test alfa-amyláza (Slovakofarma, Hlohovec). Na stanovenie počtov amylolytických baktérií bolo použité modifikované základné médium podľa autorov B r y a n t a B u r k e y (1953). Na stanovenie počtu streptokokov bol použitý selektívny agar/na izoláciu fekálnych streptokokov (Imuna, Šarišské Michaľany) a na stanovenie počtu laktobacilov bol použitý selektívny Rogosa agar.

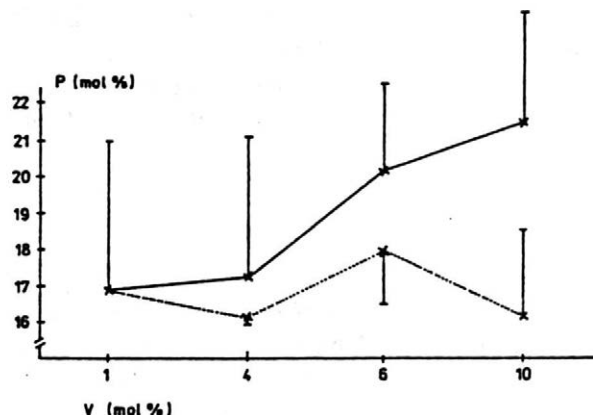
VÝSLEDKY

Priemerné denné prírastky hmotnosti za obdobie 1 - 4 týždne veku boli v oboch skupinách 0,179 kg, vo veku 6 týždňov v pokusnej skupine 0,212 kg a v kontrolnej 0,189 kg a za celé sledované obdobie dosiahli v pokusnej skupine 0,208 a v kontrolnej skupine 0,184 kg.

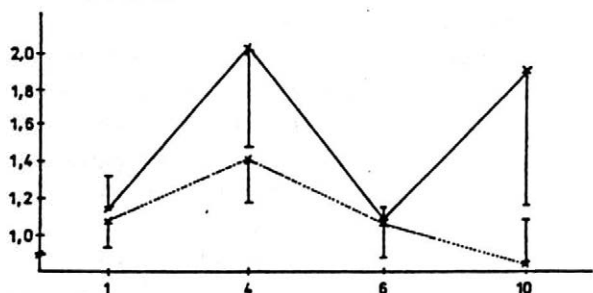
Dynamika koncentrácie celkových UMK (obr. 1) u oboch sledovaných skupín mala s vekom vzostupnú tendenciu s najvyššími hodnotami ($125,9 \pm 8,5$ mmol/l u kontrolnej a $130,7 \pm 17,2$ mmol/l u pokusnej skupiny) vo veku 10 týždňov. Rozdiely medzi skupinami neboli signifikantné. V zastúpení jednotlivých UMK sme najväčšie rozdiely zistili u kyseliny propiónovej a valérovej. Podiel kyseliny propiónovej (obr. 2) stúpal u pokusnej skupiny s vekom, s postupne narastajúcim rozdielom v prospech pokusnej skupiny. Vo veku 10 týždňov bol molárny podiel kyseliny propiónovej u pokusnej skupiny v priemere $21,5 \pm 4,1$ mol %, u kontrolnej skupiny len $16,3 \pm 2,9$ mol %. Kyselina valérová dosiahla najvyšších hodnôt u oboch sledovaných skupín vo veku 4 týždne ($2,03 \pm 0,7$ mol % v pokusnej a $1,4 \pm 0,2$ mol % v kontrolnej skupine - obr. 3). V zastúpení ostatných UMK sme nezistili výraznejšie rozdiely. Energetická výťažnosť produkcie UMK (E %) v priebehu aplikácie preparátu i po jej ukončení dosahovala u jahniat pokusnej skupiny vyšších hodnôt a pomer acetát : propionát (A : P) nižších hodnôt ako u kontrolnej skupiny (obr. 4). Najväčšie rozdiely sme zaznamenali vo veku 10 týždňov, kedy dosiahla energetická výťažnosť produkcie UMK u pokusnej skupiny v priemere $74,9 \pm 1,6$ %, u kontrolnej skupiny $72,5 \pm 1,0$ % a pomer acetát : propionát u pokusnej skupiny $3,1 \pm 0,6$ a kontrolnej skupiny $4,4 \pm 0,7$. Energetická výťažnosť produkcie UMK u jahniat pokusnej skupiny sa v priebehu celého sledovaného obdobia zvyšovala a pomer acetát : propionát sa naopak znižoval. U jahniat v kontrolnej skupine energetická výťažnosť UMK stúpala a pomer acetát : propionát v bachore klesal len do veku 6 týždňov.



1. Koncentrácia celkových unikačných mastných kyselín (UMK) v bachorovej tekutine cicajúcich jahniat; osa x - vek (týždne), ... kontrolná skupina, — pokusná skupina (platí pre obr. 1 - 5) — The concentrations of total volatile fatty acids (VFA) in the rumen fluid of sucking lambs; x-axis - age (weeks), ... control group, — experimental group (applies to Figs. 1 - 5)



2. Molárny podiel kyseliny propiónovej (P) v bachorovej tekutine cicajúcich jahniat — The molar proportion of propionate (P) in the rumen fluid of sucking lambs

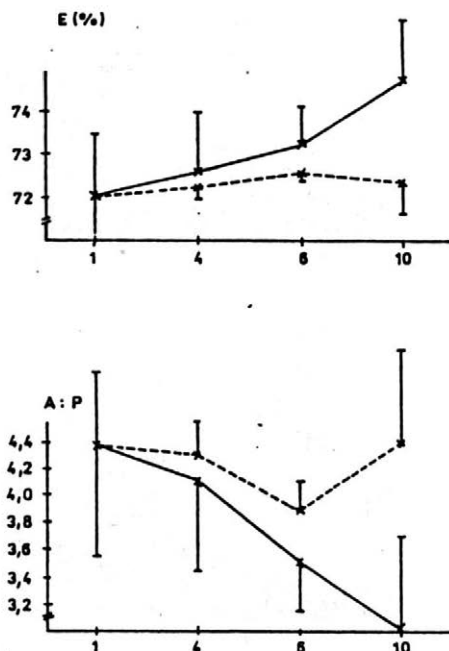


3. Molárny podiel kyseliny valérovej (V) v bachorovej tekutine cicajúcich jahniat — The molar proportion of valerate (V) in the rumen fluid of sucking lambs

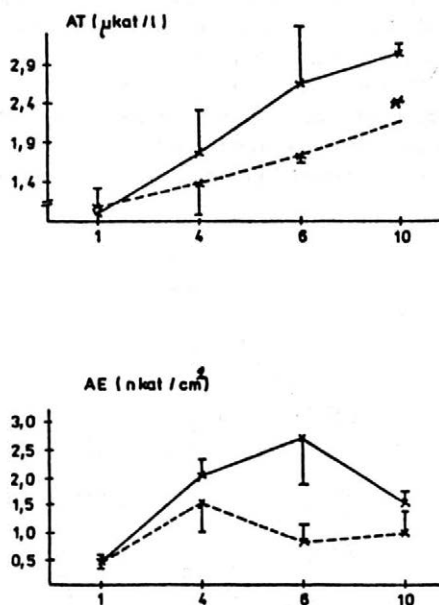
Aktivita alfa-amylázy (E.C. 3.2.1.1.) bachorovej tekutiny cicajúcich jahniat (obr. 5) mala s vekom u oboch sledovaných skupín vzostupný charakter s najväčšími rozdielmi v prospech pokusnej skupiny vo veku 6 týždňov (v kontrolnej $1,76 \pm 0,04 \mu\text{kat/l}$, v pokusnej skupine $2,7 \pm 0,5 \mu\text{kat/l}$) a vo veku 10 týždňov (kontrolná $2,2 \mu\text{kat/l}$ a pokusná skupina $3,1 \pm 0,1 \mu\text{kat/l}$; $p < 0,05$). Aktivita alfa-amylázy bachorového epitelu vykazovala u pokusnej skupiny vzostupnú tendenciu do veku 6 týždňov, kedy dosiahla oproti kontrolnej skupine trojnásobných hodnôt (kontrolná $0,86 \pm 0,2 \text{ nkat/cm}^2$, pokusná skupina $2,7 \pm 1,0 \text{ nkat/cm}^2$). U kontrolnej skupiny dosahovala aktivita alfa-amylázy v priemere vrchol vo veku 4 týždne ($1,5 \pm 0,7 \text{ nkat/cm}^2$) a potom poklesla.

Počty streptokokov v bachorovej tekutine i adherovaných na bachorový epitel (obr. 6) boli u jahniat pokusnej skupiny signifikantne vyššie ($p < 0,05$ a $p < 0,001$).

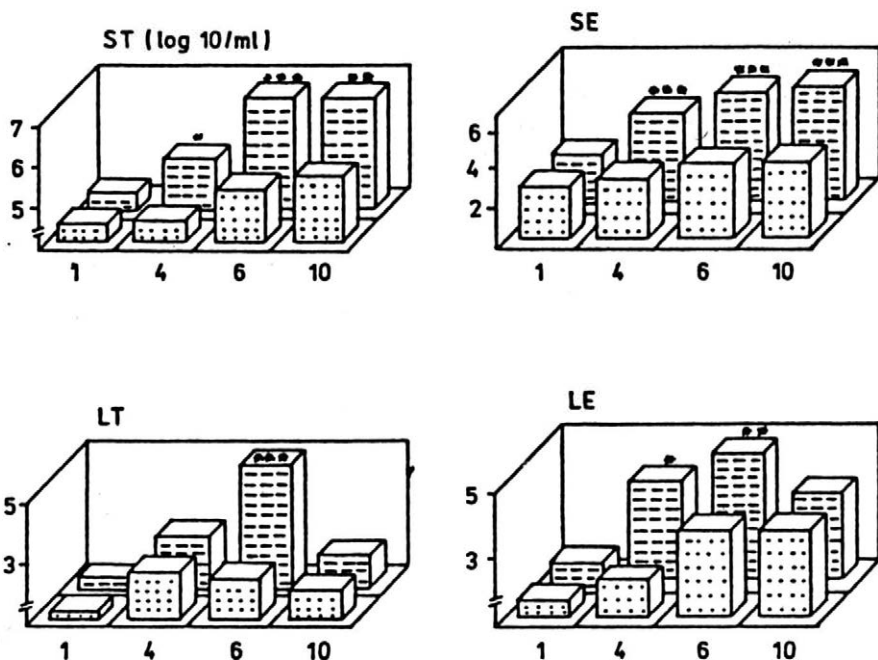
4. Energetická výťažnosť produkcie unikavých masných kyselín (E) a pomer acetát : propionát (A : P) v bachore cicajúcich jahniat — The energetic efficiency of VFA production (E) and the acetate : propionate ratio (A : P) in the rumen of sucking lambs



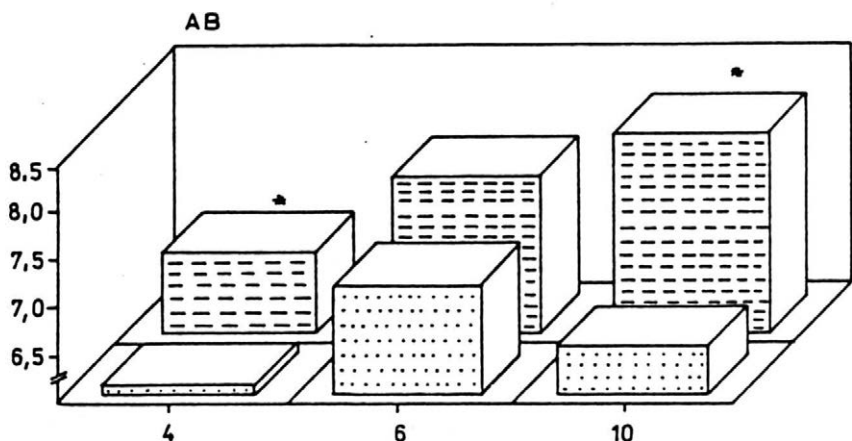
5. Aktivita alfa-amylázy bachorovej tekutiny (AT) a bachorového epitelu (AE) cicajúcich jahniat; * = $p < 0.05$ — The alpha-amylase activity of rumen fluid (AF) and rumen epithelium (AE) in sucking lambs; * = $p < 0.05$



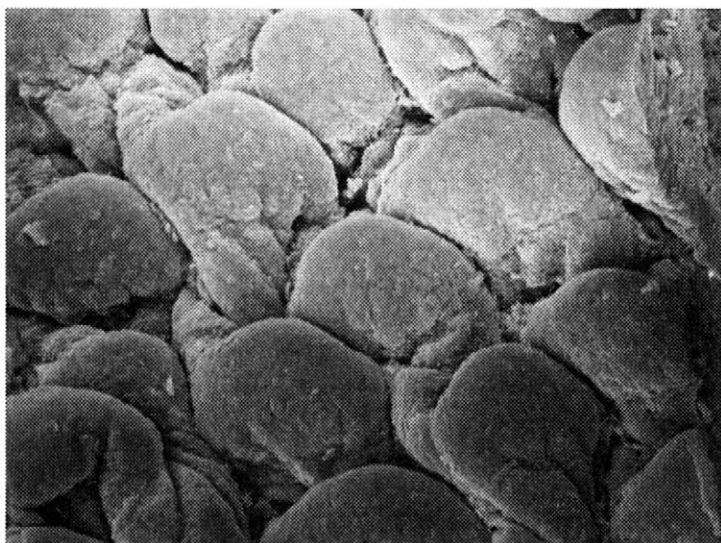
Najvyššie počty baktérií za celé sledované obdobie sme zistili u pokusnej skupiny vo veku 6 týždňov (streptokoky - bachorová tekutina 6,76 log 10/ml, bachorový epitel 6,16 log 10/ml; laktobacily - bachorová tekutina 4,9 log 10/ml, bachorový epitel 4,76 log 10/ml). Počty amylolytických baktérií v bachorovej tekutine boli



6. Počty streptokokov v bachorovej tekutine (ST) a adherovaných na bachorový epitel (SE) a počty laktobacilov v bachorovej tekutine (LT) a adherovaných na bachorový epitel (LE) u cicajúcich jahniat; osa x - vek (týždne), □ kontrolná skupina; ▤ pokusná skupina; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ (platí pre obr. 6 a 7) — The counts of streptococci in rumen fluid (ST) and of those adhered to rumen epithelium (SE) and the counts of lactobacilli in rumen fluid (LT) and of those adhered to rumen epithelium (LE) in sucking lambs; x-axis - age (weeks), □ control group, ▤ experimental group; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ (applies to Figs. 6 and 7)



7. Počty amylolytických baktérií (AB) v bachorovej tekutine cicajúcich jahniat — The counts of amylolytic bacteria (AB) in the rumen fluid of sucking lambs



8. Elektronogram bachorových papil pokusného jahňata vo veku 4 týždne (zväčšenie 68x) — Electronogramme of the rumen papillae of an experimental lamb at the age of four weeks (68x enlargement)

signifikantne ($p < 0,05$) vyššie u jahniat pokusnej skupiny vo veku 4 a 10 týždňov (obr. 7), s najvyššími hodnotami na konci sledovaného obdobia (8,05 log 10/ml).

Na snímkach zhotovených rastrovacou elektrónovou mikroskopiou možno vidieť, že bachorové papily pokusného jahňata vo veku 4 týždne (obr. 8) sú v porovnaní s jahňatom kontrolnej skupiny (obr. 9) dlhšie a diferencovanejšie.

DISKUSIA

Na podporu rozvoja bachorového trávenia mláďat prežívavcov sa doteraz overovali rôzne spôsoby dietetickej (úprava zloženia a formy suchého krmiva) a mikrobiálnej stimulácie (mikrobiotiká). Špecifická použitia mikrobiotík spočíva v možnosti pôsobiť na utváranie bachorového ekosystému a aplikácia vybraných kmeňov bachorových mikroorganizmov vytvára základ budúcej populácie s vysokou fermentačnou aktivitou. Kolonizácia vybranými kultúrami živých mikroorganizmov má umožniť včasnejší a stabilnejší nástup bachorového typu trávenia (Š i m ů n e k a K o p e č n ý, 1989).

V našej práci sme overovali nepriamy spôsob mikrobiálnej stimulácie, t.zn., že sme neaplikovali priamo bachorové baktérie, ale pokusným jahňatám sme dávali prípravok, ktorý obsahoval základné živiny a rastové faktory pre bachorovú mikroflóru v koncentrovanej forme. Pri jeho zostavovaní sme zohľadnili aj poznatky B a r t o š a (1987), ktorý medzi základné živiny bachorových baktérií radí unikavé mastné kyseliny s rozvetveným a dlhším reťazcom, valerát, amoniak, biotín, paraaminobenzoovú kyselinu a aminokyseliny.

Dosiahnuté výsledky potvrdzujú, že aplikácia prípravku mala pozitívny vplyv na úroveň bachorovej fermentácie, ktorú ovplyvnila predovšetkým z kvalitatívneho



9. Elektronogram bachorových papíl kontrolného jahňata vo veku 4 týždne (zväčšenie 68x) —
Electronogramme of the rumen papillae of a control lamb at the age of four weeks (68x enlargement)

hľadiska. Vyššie zastúpenie kyseliny propiónovej u pokusných jahniat, ktoré je cenné tak z hľadiska stimulácie vývoja bachorového epitelu, ako aj z hľadiska energetického metabolizmu, si možno vysvetliť vyššími počtami amylolytických baktérií a vyššou úrovňou ich enzýmovej aktivity vo vzťahu k tráveniu jadrovej zložky krmiva. Zmena zastúpenia jednotlivých UMK sa odrazila aj v nižšom pomere acetát : propionát a vyššej energetickej výťažnosti UMK u jahniat pokusnej skupiny. Nami zistené hodnoty celkových UMK a podielu jednotlivých UMK sú porovnateľné s údajmi autorov Jelínek a i. (1989) a hodnoty energetickej výťažnosti UMK so zisteniami autorov Baran a i. (1982) a Orskov (1975). Podobne ako v našich predchádzajúcich prácach sme zistili priamu, ale negatívnu závislosť medzi pomerom acetát-propionát a energetickou výťažnosťou produkcie UMK.

Vyššia aktivita alfa-amylázy bachorového obsahu pokusných jahniat koreluje so signifikantne vyššími počtami amylolytických baktérií u tejto skupiny. Vzostup aktivity alfa-amylázy bachorového epitelu trval u pokusných jahniat do neskoršieho veku, čo tiež pripisujeme stimulačnému účinku aplikovaného prípravku na adherentnú bachorovú mikroflóru. Dynamika alfa-amylázy bachorového epitelu s jej vzostupom do veku 4 - 6 týždňov a poklesom v neskoršom veku je podobná tej, ktorú zaznamenali aj Kmět a i. (1986). Signifikantne vyššie počty streptokokov a laktobacilov v bachorovej tekutine i adherovaných na bachorový epitel pripisujeme pozitívnemu efektu aplikovaného prípravku, ktorý svojím zložením poskytoval bachorovej mikroflóre pokusných jahniat väčšie množstvo živín v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Zistené priemerné denné prírastky u cicajúcich jahniat sú blízke údajom autorov Skřivánek a i. (1990). Z tohto hľadiska je možno očakávať výraznejší efekt predovšetkým po odstave, kedy by sa mala prejavíť vyššia úroveň funkčného rozvoja bachora.

Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že overovaný prípravok určený na stimuláciu bachorovej fermentácie je účinný. Pre objektivizáciu jeho účinnosti ho hodláme overiť u gnotobiotických zvierat v definovaných podmienkach.

Literatúra

- BARAN, M. - JALČ, D. - KALAČNJUK, G. I. - BOĎA, K. - ZELENÁK, I.: Výťažnosť premeny energie hexózu na energiu tvorby unikavých mastných kyselín v bachore oviec kŕmených diétami s pilinami. *Veter. Med. (Praha)*, 27, 1982, s. 585-593.
- BARTOŠ, S.: Mikrobiológia a biochemie trávení v bachoru prežvýkavců. Praha, ČSAV 1987.
- BRYANT, M. P. - BURKEY, L. A.: Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous group of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.*, 36, 1953, s. 205-217.
- CRUYWAGEN, C. W. - HORN, J. G.: Pre-weaning growth and feed intake of dairy calves receiving different combinations of soybean flour, whey powder and colostrum. *S. Afr. J. anim. Sci.*, 15, 1985, s. 11-14.
- DEMEYER, D. - VAN NEVEL, C. - TELLER, E. - GODEAU, J. M.: Manipulation of rumen digestion in relation to the level of production in ruminants. *Arch. anim. Nutr. (Berlin)*, 36, 1986, s. 132-143.
- FONTY, G. - GOUET, P. - JOUANY, J. - SENAUD, J.: Ecological factors determining establishment of cellulolytic bacteria and protozoa in the rumens of meroxenically lambs. *J. gen. Microbiol.*, 129, 1983, s. 213-223.
- HOLUB, A. a kol.: Fyziologie hospodářských zvířat. Praha, SZN 1969.
- HUTJENS, M. F.: Skilful use of colostrum, selection of appropriate liquid diets, and transition to a dry calf starter diet are essential in minimizing calf losses. *Mod. veter. Pract.*, 66, 1985, s. 451-454.
- JELÍNEK, P. - JELÍNEK, K. - DVOŘÁK, R.: Vývojové a dietetické faktory ovlivňující morfológické a funkční parametry předžaludku a slezu ovčí. In: Sbor. Ref. Intenzifikační faktory pastvy ovčí, Brno, ČSVTS 1989, s. 23-34.
- KLEIN, R. D. - KINCAID, R. L. - HODGSON, A. S. - HARRISON, J. H. - HILLERS, J. K. - CRONRATH, J. D.: Dietary fiber and early weaning on growth and rumen development of calves. *J. Dairy Sci.*, 70, 1987, s. 2095-2104.
- KMEŤ, V. - BOĎA, K. - KALAČNJUK, G. I.: Ovplyvňovanie vývoja epimurálnej mikroflóry teliat a jahniat. *Veterinárství*, 34, 1984, s. 219-221.
- KMEŤ, V. - BOĎA, K. - JAVORSKÝ, P. - GIBALOVÁ, R.: Dynamics of enzymatic activity development in the adherent rumen microflora. *Arch. anim. Nutr. (Berlin)*, 36, 1986, s. 621-628.
- ORSKOV, E. R. - FLATT, W. P. - MOE, P. W.: Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acids formation in ruminants. *J. Dairy Sci.*, 51, 1968, s. 1429-1435.
- ORSKOV, E. R.: Manipulation of rumen fermentation for maximum food utilization. In: BOURNE, G. H. (ed.): World review of nutrition and dietetics. 22, Basel, S. Karger 1975.
- ORSKOV, E. R.: Proteinovoje pítanije žvačnych životnych. Moskva, Agropromizdat 1985.
- SKŘIVÁNEK, M. - DRAŽAN, J. - HOFÍREK, B. - ILLEK, J.: Vývoj zdravotního stavu a vybraných klinicko-biochemických ukazatelů u jehňat v období mléčné výživy, zajišťované mléčnou krmnou směsí. *Veterinárství*, 40, 1990, s. 441-443.
- ŠIMŮNEK, J. - KOPEČNÝ, J.: Některé aspekty použití mikrobiotik v časně výživě mláďat prežvýkavců. In: Sbor. Ref. Nejnovější poznatky v uplatnění biologicky aktivních aditiv ve výživě telat, Uhřetěves, ČSVTS 1985, s. 69-74.

BOMBA, A. - ŽITŇAN, R. - KONIAROVÁ, I. - STACHOVÁ, M. - KOLODZIEYSKI, L. - FEJEŠ, J. - LENÁRT, J. (Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice; Research Institute of Animal Production, Nitra, branch at Košice; University of Veterinary Medicine, Košice; Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice):

Stimulation of rumen fermentation in sucking lambs.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (5) : 275-285.

The effect of administration of a preparation containing nutrients and growth factors which stimulate rumen bacteria was investigated with respect to the level of rumen fermentation in sucking lambs. The preparation was administered orally at a dose of 1.5 g per lamb/day to lambs at the age of 1 to 6 weeks. In addition to genuine milk, both groups of lambs received a concentrate mixture and had free choice of hay and water. Two lambs from the experimental group and two lambs from the control group were slaughtered at the age of 1, 4, 6, 10 weeks.

The average daily weight gains over the period of 1 to 4 weeks were 0.179 kg in the control and experimental groups, 0.212 kg in the experimental group at the age of six weeks, and 0.189 kg in the control group at the same age while over the whole period of investigation they were 0.208 kg and 0.184 kg in the experimental and control group, respectively.

The dynamics of total volatile fatty acid concentrations (Fig. 1) showed an increasing trend in both investigated groups with the growing age while the highest values (125.9 ± 8.5 mmol/l in the control group and 130.7 ± 17.2 mmol/l in the experimental group) were recorded at the age of 10 weeks. The between-the-group differences were not significant. As for the percentage of individual volatile fatty acids, the largest differences were observed in propionate and valerate. The percentage of propionate (Fig. 2) was increasing with the growing age of lambs of the experimental group, and this difference enlarged in favour of the experimental group. At the age of 10 weeks, the molar proportion of propionate was on average 21.5 ± 4.1 mol % in the experimental group, and only 16.3 ± 2.9 mol % in the control group. The valerate values were highest in both investigated groups at the age of four weeks (2.03 ± 0.7 mol % in the experimental group and 1.4 ± 0.2 mol % in the control group; Fig. 3). There were not any larger differences in the percentages of the other VFA. The energetic efficiency of VFA production (E %) showed the higher values in the lambs of experimental group in the course of preparation administration and after its termination, and the acetate to propionate ratio (A : P) was lower than in the control group (Fig. 4). The differences were largest at the age of ten weeks, when the energetic efficiency of VFA production was on average 74.9 ± 1.6 % in the experimental group, and 72.5 ± 1.0 % in the control group, while the acetate : propionate ratios were 3.1 ± 0.6 and 4.4 ± 0.7 in the experimental and control group, respectively. The energetic efficiency of VFA production was rising in the lambs of experimental group during the whole period of investigation, and on the other hand the acetate : propionate ratio was decreasing. In the lambs of control group the energetic

efficiency of VFA was increasing and the acetate : propionate ratio in the rumen was decreasing to the age of six weeks only.

The alpha-amylase (E.C.3.2.1.1.) activity of the rumen fluid of sucking lambs (Fig. 5) showed an increasing trend with the growing age in both investigated groups, with the largest differences in favour of the experimental group at the age of six weeks ($1.76 \pm 0.04 \mu\text{kat/l}$ in the control group, $2.7 \pm 0.5 \mu\text{kat/l}$ in the experimental group) and at the age of 10 weeks ($2.2 \mu\text{kat/l}$ in the control group and $3.1 \pm 0.1 \mu\text{kat/l}$ in the experimental group; $p < 0.05$). The alpha-amylase activity of rumen epithelium had an increasing trend in the experimental group to the age of six weeks, when it reached threefold values in comparison with the control group (control group $0.86 \pm 0.2 \text{ nkat/cm}^2$, experimental group $2.7 \pm 1.0 \text{ nkat/cm}^2$). In the control group, the peak of alpha-amylase activity was recorded on average at the age of four weeks ($1.5 \pm 0.7 \text{ nkat/cm}^2$), then the activity decreased.

The counts of streptococci and lactobacilli in the rumen fluid and of those adhered to the rumen epithelium (Fig. 6) were significantly higher ($p < 0.05$ and $p < 0.001$) in the lambs of the experimental group. The highest counts of bacteria over the whole period of investigation were determined in the experimental group at the age of six weeks (streptococci - rumen fluid: $6.76 \log 10/\text{ml}$, rumen epithelium: $6.16 \log 10/\text{ml}$, lactobacilli - rumen fluid: $4.9 \log 10/\text{ml}$, rumen epithelium $4.76 \log 10/\text{ml}$). The counts of amylolytic bacteria in the rumen fluid were significantly ($p < 0.05$) higher in the lambs of experimental group at the age of four and ten weeks (Fig. 7), with the highest values at the end of the period of investigation ($8.05 \log 10/\text{ml}$).

The photos taken by scanning electron microscopy show that the rumen papillae of an experimental lamb at the age of four weeks (Fig. 9) are longer and more differentiated in comparison with a lamb of control group (Fig. 8).

lambs; stimulating preparation; rumen fermentation

Contact Address:

MVDr. Alojz B o m b a , CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny,
Hlinkova 1/A, 041 81 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 37429, fax 095 31853

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 6/1993 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny tyto příspěvky:

Šmíd B., Valíček L., Rodák L., Kudrna J., Musilová J.: Elektronově mikroskopický průkaz viru epidemické diarrhoey prasat v České republice

Neuschl J., Čižmarová J., Lopuchovský J.: Vplyv herbicídu bentazón československej proveniencie na invadovanosť oviec gastroenteronematódami

Krajničáková M., Bekeová E., Hednrichovský V., Maraček I.: Koncentrácie celkových lipidov, cholesterolu a progesterónu v čase synchronizácie ruje a v priebehu gravidity oviec

Bekeová E., Krajničáková M., Hednrichovský V., Maraček I.: Alkalická fosfatáza v puerpériu bahníc a jej vzťah k hormónom štítnej žľazy a ovariálnym steroidom

Čorba J., Várady M., Praslička J., Veselý L.: Antihelmintické ovplyvnenie polyrezistentných nematódov gastrointestinálneho traktu u importovaných kôz

Juřicová Z., Hubálek Z., Halouzka J., Macháček P.: Virologické vyšetření kormoránů velkých na arboviry

DLHODOBÁ EXPOZÍCIA BROJLEROVÝCH KURČIAT PCB - METABOLICKÉ A IMUNOTOXICKÉ ÚČINKY

J. Košutzký¹, E. Košutzká¹, L. Lenčuchová²

¹Výskumný ústav chovu hydiny, Ivanka pri Dunaji

²Štátny veterinárny ústav, Nitra

Sledovali sa klinické, metabolické a patologicko-anatomické účinky polychlórovaných bifenylov (PCB) u brojlerových kurčiat. Použili sa pôvodné komerčné výrobky PCB (Delor 103 a Delor 105) v dávke 5 a 50 mg/kg krmiva, dĺžka expozície od 1 do 42 dní veku. Hmotnosť kurčiat bola významne ovplyvnená vo veku 21 a 28 dní, nie však pri konci pokusu (42 dní). Častým pitevným nálezom u exponovaných kurčiat bola hepatitída a hydroperikarditída. Hmotnosť pečene preukazne narastala, hmotnosť lymforetikulárnych orgánov významne poklesla. Hladiny cholesterolu a triglyceridov preukazne stúpali. U exponovaných skupín sa pozorovali nižšie hodnoty lyzozýmu v krvnom sére, rozdiel nebol štatisticky významný. Dlhodobá aplikácia PCB preukazne znižovala hladiny vitamínu A v pečeni, nepozoroval sa pokles hladín vitamínu E. Významný imunosupresívny účinok sa prejavil nižším titrom protilátok na preventívnu vakcináciu (AVIPEST-NDV) a imunizáciu inými antigénami (SRBC, Ba-antigén). Pozorovalo sa výrazné imunotoxické pôsobenie, involúcia lymfatického tkaniva, zhoršenie krvného obrazu a charakteristický pitevný nález.

kurčatá; polychlórované bifenyly (PCB); metabolické zmeny; imunotoxické účinky

Dôležitosť štúdia vplyvov prostredia a chemizačných faktorov narastá aj v oblasti hydínarskej výroby. Dôkazom toho sú aj údaje z posledných rokov o tom, že podiel neinfekčných a metabolických chorôb u brojlerov prevyšuje 50 % z celkových strát pripisovaných chorobám kurčiat vo výkrme.

Práce o nepriaznivých biologických účinkoch PCB na modely hydiny sme prezentovali už dávnejšie (K o š u t z k ý a i., 1979; B o b á k o v á a i., 1980; K o š u t z k ý, 1987). Reálne vzniknuté problémy v živočíšnej výrobe u nás sa začali objavovať až neskôr, hlavne v súvislosti s prienikom PCB do potravinového reťazca hospodárskych zvierat. V ostatných rokoch sa o polychlórovaných bifenyloch vedie osvetová kampaň, hlavne z dôvodov zaistenia prevencie kontaminácie prostredia. Jej významnou súčasťou je monitorizácia týchto látok v najrôznejších komoditách. Vzhľadom k lipofilným a vysoko perzistentným vlastnostiam PCB v biologických materiáloch a prostredí, ako aj nutnosti využívať pri ich detekcii špičkovú analytickú techniku, vytvorili sa v tomto smere aj viaceré medzinárodné výskumné projekty. Časť účinkov týchto látok zostáva sledovaná hlavne zo strany inštitúcií zameraných na preventívnu humánnu a veterinárnu medicínu a hygienu (S a f e a H u t z i n g e r, 1987; P i s k a č a i., 1990; R u p r i c h a P i s k a č, 1990; H a l o u z k a a i., 1990; P e t r í k a i., 1991; K o č a n a i., 1991).

Napriek obmedzeniu komerčného využívania PCB a zákazu jeho výroby (1984) zostávajú v súčasnosti nebezpečenstvom ich zásoby a kontaminované odpady odhadované u nás na 10 000 t (Petrík a i., 1991). V hydínárstve možno očakávať náhodné kontaminácie krmiva (únik hydraulických olejov), prípadne kontakt hydiny s materiálom obsahujúcim PCB (farby, omietky, kontaminovaná podstielka a pod.). Okrem toho sa účinky PCB u brojlerových kurčiat dávajú do súvislosti so vznikom tzv. edémovej choroby, resp. hydroptického syndrómu. Nemenej dôležité sú popísané vzťahy nepriaznivého farmakodynamického efektu a imunosupresívnych vlastností, čo by mohlo mať významný dopad nielen na výsledky výkrmu brojlerov vo veľkochovoch, ale aj na ich zdravotný stav. Viaceré práce naznačili interakcie s hormónmi a vitamínmi (Košinová a i., 1977; Hudecová a i., 1977; Bobáková a i., 1981) a metabolizmom minerálnych látok (Lopuchovský, 1986; Ruprich a Piskač, 1990). Významnou vlastnosťou väčšiny cudzorodých látok, obzvlášť PCB je indukcia mikrozomálnych enzýmov pečene (Bobáková a i., 1978, 1981). Táto môže mať nepriaznivé dôsledky na rýchlosť metabolizácie hormónov a vitamínov ako aj preukazný farmakodynamický efekt na lipofilné liečivá podávané cielene, napr. vo veľkochovoch. Z rôznych typov PCB patria medzi najtoxickejšie 3,3',4,4',5-pentachlórbyfenyly, ktoré najúčinnejšie indukujú mikrozomálne enzýmy pečene (Brunström, 1989).

Cieľom tohoto pokusu bolo získať podklady o nepriaznivých biologických účinkoch PCB u brojlerových kurčiat exponovaných počas výkrmu nízkym hladinám týchto perzistentných látok. Zamerali sme sa na hodnotenie metabolických a imunotoxických účinkov PCB.

MATERIÁL A METÓDA

120 kusov jednodenných sexovaných kohútikov HYBRO (finál) sa odvážilo, očíslovalo a rozdelilo náhodným výberom po 40 kusoch do troch oddelení na hlbokú podstielku. Pokusný priestor sa vykuroval elektrickými kvočňami, použil sa nepretržitý svetelný režim, kŕmenie a napájanie *ad libitum*. Na pokus sa použila kŕmna zmes BR2 (ME 12,8 MJ, N-látky 19,9 %) namiešaná podľa platnej receptúry na VÚH. Pre skupiny PCB bola kŕmna zmes kontaminovaná rovnakým dielom preparátov PCB (výrobky Chemko Strážske - Delor 103 a Delor 105) v dávke 5 a 50 mg/kg krmiva. PCB sa rozpustilo v 200 ml chloroformu, ktorý sa aplikoval na 3 kg premixu sypkej zmesi BR2 a po dokonalom premiešaní vzorky sa nechal voľne odpariť cez noc pri laboratórnej teplote. 3 kg premixu sa použili na prípravu kontaminovanej zmesi (30 kg) v miešačke. Pre prípravu premixu kontrolnej skupiny sa použilo 200 ml čistého chloroformu. Pokus bol usporiadaný v troch skupinách:

1. skupina bola kontrolná (40 ks), 2. skupina - dávka 5 mg PCB na 1 kg krmiva (40 ks), 3. skupina - dávka 50 mg PCB na 1 kg krmiva (40 ks).

Expozícia kurčiat PCB trvala od 1. do 42. dňa veku. U kurčiat sa sledovali tieto parametre:

- Hmotnosť kurčiat: váženie sa vykonalo vždy po 12-hodinovej hladovke, každý týždeň (1. - 6. týždeň).
- Relatívna hmotnosť orgánov: pečeň, Fabriciov váčok, týmus, slezina vo veku 21, 28, 35 a 42 dní (vždy po 6 ks z každej skupiny).

- Stanovenie cholesterolu, triglyceridov a bielkovín v krvnom sére v rovnakých časových intervaloch pomocou bežných komerčných súprav LACHEMA.
- Stanovenie vápnika sa vykonalo titračnou komplexometrickou metódou za použitia indikátora fluorexonu (H o m o l k a , 1969).
- Hladiny vitamínu A a E sa stanovili pri konci pokusu vo veku 42 dní (vždy v pravom laloku pečene kurčiat) fluorometrickou metódou.
- Hladiny protilátok na opakovanú imunizáciu kurčiat vakcínou proti pseudomoru (AVIPEST) sa hodnotili na ŠVÚ v Nitre. Imunizácia sa robila aplikáciou jednej kvapky antigénu do oka kurčiat vo veku 9 a 28 dní.
- Hladiny lyzozýmu v krvnom sére sa stanovili vo veku 21, 28, 35 a 42 dní kolorimetrickou metódou (*Micrococcus lysodeicticus*).
- Krvný obraz kurčiat: Hemoglobín sa stanovil fotometrickou kyánhemoglobínovou metódou (H r u b i š k o a H u l e , 1970) za použitia fotokolorimetra Spekol. Na zhotovenie kalibračnej krivky bol použitý Sevatest Štandard Hb (Imuna, Šarišské Michaľany). Na počítanie erytrocytov sa použila Bürkerova baničková metóda a Hayemov roztok podľa návodu autorov H r u b i š k o a H u l e (1970) s 200-násobným riedením za použitia heparinizovanej venóznej krvi, v Bürkerovej komôrke. Mikrohematokrit sa stanovil metódou autorov H r u b i š k o a H u l e (1970) za použitia sklenených kapilár a mikrohematokritovej odstredivky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V daných experimentálnych podmienkach sa použili relatívne nízke dávky PCB k získaniu údajov o klinických a biochemických zmenách u brojlerov počas výkrmu. Nakoľko sa PCB podávalo kontinuálne od 1. do 42.dňa veku, významnosť pozorovaných zmien narastala so zvyšovaním veku a spotreby krmiva. Z hľadiska presnosti práce sa zvolila pre celý pokus sypká zmes BR2, ktorá sa kontaminovala dávkami PCB 5 a 50 mg/kg krmiva. Z uvedeného dôvodu sú výsledky hmotností brojlerových kurčiat neobvykle nízke, a to v rámci všetkých skupín (tab. I). Pri hodnotení hmotností v prvej polovici pokusu badať tendenciu poklesu hmotnosti u PCB skupín (preukazne vo veku 21, 28 a čiastočne vo veku 35 dní), pričom nebolo badať rozdiel medzi skupinou 5 a 50 mg PCB. V ďalšom priebehu došlo k vyrovnaniu hmotnosti kurčiat na úroveň kontrolnej skupiny. Vo veku 42 dní vykazovali najvyššiu hmotnosť kurčatá exponované PCB (50 mg). Na rozdiel od relatívne nízkych dávok PCB v tomto pokuse, popisuje P i s k a č a i. (1990) po akútnej intoxikácii (1000 mg/kg PCB) preukazne zníženú hmotnosť kurčiat. Reálnejší obraz o nepriaznivých biologických účinkoch dávajú výsledky pitiev a patologicko-anatomické nálezy (hepatitída, hydroperikarditída a iné). Rozdiely sa prejavili i v relatívnej hmotnosti orgánov kurčiat (tab. II). Z prezentovaných údajov je zrejmé, že s dĺžkou aplikácie narastá hmotnosť pečene a klesá hmotnosť lymforetikulárnych orgánov (burza, týmus, slezina). Podobne nálezy biochemických ukazovateľov v krvnom sére kurčiat (tab. III) poukazujú na závažné metabolické poruchy, súvisiace s ťažkým poškodením centrálného metabolického orgánu - pečene. Hladiny cholesterolu a triglyceridov preukazne stúpali, hladiny celkových bielkovín neboli

I. Zmeny v hmotnosti (g) brojlerových kurčiat po aplikácii PCB v krmive ($x \pm s$) — Variations in the weight (g) of broiler chicks after administration of dietary PCB ($x \pm s$)

Skupiny ¹	Vek kurčiat (dni) ²						
	1	7	14	21	28	35	42
Kontrola ³	45 ± 4	116 ± 17	210 ± 31	341 ± 37	536 ± 51	801 ± 66	1000 ± 112
PCB 5	45 ± 3	123 ± 13	199 ± 24	305 ± 29**	463 ± 41**	753 ± 72*	986 ± 90
PCB 50	45 ± 4	122 ± 16	194 ± 27*	303 ± 34**	463 ± 37**	772 ± 63	1024 ± 84

* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$

¹ groups, ² chicken age (days), ³ control

Vysvetlivky pre tab. I až VIII - Explanatory notes to Tabs. I to VIII:

PCB 5 = dávka 5 mg PCB na 1 kg krmiva — a dose of 5 mg PCB per 1 kg of feed

PCB 50 = dávka 50 mg PCB na 1 kg krmiva — a dose of 50 mg PCB per 1 kg of feed

II. Relatívna hmotnosť pečene, Fabríciovho váčku, týmusu a sleziny u brojlerových kurčiat po aplikácii PCB v krmive ($x \pm s$) — Relative weights of liver, bursa Fabricii, thymus and spleen in broiler chicks after administration of dietary PCB ($x \pm s$)

Relatívna hmotnosť orgánov (g/100 g ž.h.) ¹	Skupiny ²	Vek kurčiat (dni) ³			
		21	28	35	42
Pečeň ⁴	kontrola ⁸	3,8 ± 0,2	2,8 ± 0,3	2,5 ± 0,2	2,3 ± 0,3
	PCB 5	3,5 ± 0,6	2,4 ± 0,2*	2,4 ± 0,2	3,4 ± 0,5**
	PCB 50	4,0 ± 0,4	2,8 ± 0,2	3,1 ± 0,4*	5,2 ± 0,4**
Fabríciov váček ⁵	kontrola ⁸	0,34 ± 0,08	0,37 ± 0,11	0,39 ± 0,09	0,39 ± 0,04
	PCB 5	0,37 ± 0,11	0,28 ± 0,03*	0,32 ± 0,08	0,35 ± 0,07
	PCB 50	0,25 ± 0,05*	0,22 ± 0,01**	0,21 ± 0,03**	0,29 ± 0,06*
Týmus ⁶	kontrola ⁸	0,33 ± 0,08	-	0,36 ± 0,06	-
	PCB 5	0,36 ± 0,12	-	0,28 ± 0,05	-
	PCB 50	0,41 ± 0,12	-	0,26 ± 0,03*	-
Slezina ⁷	kontrola ⁸	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,18 ± 0,05
	PCB 5	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,17 ± 0,07
	PCB 50	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02*

* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$

¹ relative organ weight (g/100 g lw.), ² groups, ³ chicken age (days), ⁴ liver, ⁵ bursa Fabricii, ⁶ thymus, ⁷ spleen, ⁸ control

III. Účinok PCB v krmive na hladinu cholesterolu, triglyceridov, celkových bielkovín a vápnika v krvnom sére brojlerových kurčiat ($x \pm s$) — The effects of dietary PCB on the concentrations of cholesterol, triglycerides, total proteins and calcium in the blood serum of broiler chicks ($x \pm s$)

Sledovaný parameter ¹	Skupiny ²	Vek kurčiat (dni) ³			
		21	28	35	42
Cholesterol ⁴ (nmol/l)	kontrola ⁸	3,7 ± 0,4	4,3 ± 0,4	4,1 ± 0,2	-
	PCB 5	4,4 ± 0,5*	4,6 ± 0,5	4,5 ± 0,5	-
	PCB 50	4,4 ± 0,4**	4,8 ± 0,4**	5,7 ± 0,8**	-
Triglyceridy ⁵ (nmol/l)	kontrola ⁸	-	-	2,3 ± 0,6	2,0 ± 0,5
	PCB 5	-	-	2,3 ± 0,4	3,1 ± 0,7*
	PCB 50	-	-	2,5 ± 0,4	4,6 ± 1,2**
Celkové bielkoviny ⁶ (g/100 ml)	kontrola ⁸	32,2 ± 2,3	-	-	32,5 ± 4,0
	PCB 5	31,9 ± 2,9	-	-	32,2 ± 2,2
	PCB 50	31,5 ± 3,82	-	-	33,8 ± 4,1
Vápnik ⁷ (mE/l)	kontrola ⁸	4,5 ± 0,5	4,8 ± 0,4	4,7 ± 0,5	4,7 ± 0,4
	PCB 5	3,8 ± 0,4	3,7 ± 0,3**	4,0 ± 0,3*	4,6 ± 0,3
	PCB 50	3,7 ± 0,1	3,7 ± 0,2**	3,7 ± 0,1**	4,6 ± 0,3

* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$

¹investigated parameter, ²groups, ³chicken age (days), ⁴cholesterol, ⁵triglycerides, ⁶total proteins, ⁷calcium, ⁸control

preukazne zmenené. Hladiny sérového vápnika preukazne poklesli vo veku 28 a 35 dní, vo veku 42 dní boli rozdiely nepreukazné. Zmeny v hladinách lyzozýmu v sére brojlerových kurčiat prezentuje tab. IV. U kontrolnej skupiny sa pozorovali relatívne vyrovnané hodnoty lyzozýmu v rozmedzí 6,7 - 7,7 mg/l. U exponovaných skupín sa pozorovali v priemere nižšie hodnoty lyzozýmu ako u kurčiat kontrolnej skupiny, rozdiely neboli štatisticky významné.

Na výrazný imunotoxický účinok poukazuje aj nižší titer protilátok na opakovanú imunizáciu brojlerových kurčiat vakcínou proti pseudomoru (AVIPEST). Priemerný titer protilátok bol u kurčiat exponovaných PCB preukazne nižší (tab. V). Podobný imunosupresívny účinok PCB sa zaznamenal pri použití iných antigénov (SRBC, Ba-antigén), čo sumarizuje tab. VI. Celkový nepriaznivý účinok expozície kurčiat dokresľuje aj zhoršený krvný obraz, a to vo všetkých sledovaných ukazovateľoch (tab. VII).

Hladiny lipofilných vitamínov v pečeni (vitamín A a E) môžu byť dobrým vodičkom pre hodnotenie zdravotného stavu kurčiat a odrážajú funkčný stav dôležitého detoxikačného orgánu - pečene. Na významnú interakciu PCB s biologickou účinnosťou vitamínu D u kurčiat poukázal L o p u c h o v s k ý (1986) a jeho výsledky svedčia o poruchách homeostázy a farmakokinetiky cholekalciferolu.

IV. Účinnok PCB na hladinu lyzozýmu (mg/l) v sére brojlerových kurčiat ($x \pm s$) — The effect of PCB on lysozyme concentrations (mg/l) in the blood serum of broiler chicks ($x \pm s$)

Skupiny ¹	Vek kurčiat (dni) ²			
	21	28	35	42
Kontrola ³	7,7 $\pm$ 1,1	7,3 $\pm$ 1,7	7,4 $\pm$ 1,9	6,7 $\pm$ 1,4
PCB 5	5,1 $\pm$ 1,1*	7,4 $\pm$ 1,1	6,0 $\pm$ 1,8	5,5 $\pm$ 1,3
PCB 50	5,9 $\pm$ 1,5	6,0 $\pm$ 1,4	6,8 $\pm$ 1,1	6,0 $\pm$ 0,6

* = $P < 0,05$

¹ groups, ² chicken age (days), ³ control

V. Priemerný titer protilátok u kontrolných a exponovaných kurčiat po opakovanej imunizácii kurčiat vakcínou proti pseudomoru (AVIPEST). Výsledky sérologického vyšetrenia (HIT - NDV) — Average antibody titres in control and exposed chicks after chick repeated immunization with a vaccine against Newcastle disease (AVIPEST). The results of serological examination (HIT - NDV)

Skupiny ¹	Imunizácia vo veku (dni) ²	Stanovenie protilátok vo veku (dni) ³	Priemerný titer ⁴
Kontrola ⁵	9 a 28	42	1 : 38
PCB 5	9 a 28	42	1 : 12*
PCB 50	9 a 28	42	1 : 7**

Stanovenia sa vykonali na Štátnom veterinárnom ústave v Nitre — The determinations were performed in the State Veterinary Institute at Nitra

* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$

¹ groups, ² immunization at the age of (days), ³ determination of antibodies at the age of (days), ⁴ average titre, ⁵ control

VI. Priemerný titer protilátok u brojlerov exponovaných PCB — The average titres of antibodies in PCB-exposed broilers

Skupiny ¹	Priemerný titer protilátok ² (log 2)				
	primárna odpoveď ³			sekundárna odpoveď ⁴	
Dni stanovenia protilátok po imunizácii ⁵	6	10	14	4	7
Kontrola ⁶	4,1	2,0	0,9	2,7	2,5
PCB 5 (SRBC-antigén)	1,5	1,0	0,3	0,5	0,9
Kontrola ⁶	5,4	5,6	-	4,9	6,6
PCB 50 (Ba-antigén)	2,9	3,3	-	3,4	4,4

¹ groups, ² average titres of antibodies, ³ primary reaction, ⁴ secondary reaction, ⁵ days of antibody determination after immunization, ⁶ control

VII. Účinnok PCB podávaných v krmive brojlerových kurčiat na ukazovatele krvného obrazu — The effects of dietary PCB administered to broiler chicks on the parameters of blood picture

Skupiny ¹	Vek kurčiat (dni) ²	Počet stanovení ³	Hemoglobín ⁴ (g%)	Počet erytrocytov ⁵ ($\cdot 10^{12}/l$)	Hematokrit ⁶ (%)
Kontrola ⁷	42	10	87 ± 2	2,4 ± 0,1	30 ± 1
PCB 5	42	6	81 ± 2	2,2 ± 0,1	29 ± 1
PCB 50	42	6	75 ± 2	1,9 ± 0,1	26 ± 1

¹ groups, ² chicken age (days), ³ number of determinations, ⁴ haemoglobin, ⁵ erythrocyte counts, ⁶ haematocrit, ⁷ control

VIII. Priemerné hladiny vitamínu A a E v pečeni brojlerových kurčiat po dlhodobej expozícii PCB ($x \pm s$) — The average concentrations of vitamins A and E in the liver of broiler chicks after their long-range exposure to PCB ($x \pm s$)

Skupiny ¹	Vek kurčiat (dni) ²			
	21	28	35	42
Vitamín A (μg vitamínu A acetátu/lg pečene) ³				
Kontrola ⁴	15,8 ± 2,0	24,1 ± 6,4	27,5 ± 2,8	28,8 ± 4,8
PCB 5	22,0 ± 5,9	27,5 ± 7,0	29,5 ± 11,4	17,1 ± 6,1
PCB 50	15,5 ± 4,4	18,2 ± 4,2	22,4 ± 3,4	13,1 ± 3,1
Vitamín E (μg vitamínu E acetátu/lg pečene) ⁵				
Kontrola ⁴	28,0 ± 4,8	26,0 ± 6,6	34,9 ± 5,7	27,9 ± 7,9
PCB 5	29,0 ± 4,1	40,4 ± 13,6	36,6 ± 17,9	36,0 ± 6,0
PCB 50	26,0 ± 8,0	31,4 ± 10,5	24,0 ± 3,5	26,6 ± 1,8

Počet stanovení bol 5 - 8 za každú skupinu — The number of determinations was 5 - 8 in each group
¹ groups, ² chicken age (days), ³ vitamin A (μg acetate vitamin A/1 g of liver), ⁴ control, ⁵ vitamin E (μg of acetate vitamin E/1 g of liver)

K poruchám dochádza aj pri podrobnejšom hodnotení hladín ďalších hormónov - tyroxínu, trijódtyronínu, androgénov a estrogénov (Herzig a i., 1985; Košťálek, 1987; Ruprich a Piskač, 1990). V pokuse sme opakovane stanovili hladiny oboch vitamínov v pečeni brojlerov rôzneho veku (tab. VIII). Potvrďilo sa, že polychlóvané bifenyly nepriaznivo pôsobia na hladinu vitamínu A. K jeho poklesu dochádza hlavne v skupine s vyššou dávkou PCB. Zo získaných výsledkov je zrejmé, že nižšia použitá dávka (5mg/kg) vyvolala pokles hladín vitamínu A až pri konci aplikačného obdobia (42 dní). Hodnoty vitamínu E (ako prirodzeného antioxidantu) nasvedčujú na tesný vzťah k toxickým účinkom PCB s tendenciou zvyšovania jeho hladín v pečeni. Toto pôsobenie sa dáva do súvislosti

s aktiváciou detoxikačných enzymatických mechanizmov heparu (H u d e c o v á a i., 1977).

Celkove možno zo sledovaných klinických a metabolických ukazovateľov u brojlerov exponovaných PCB poukázať hlavne na zmeny týchto parametrov:

- výskyt hydroperikardu a perihepatitídy,
- výrazný pokles hmotnosti lymfoidných orgánov,
- vzostup triglyceridov a cholesterolu v krvnej plazme,
- pokles titra protilátok na vakcináciu (AVIPEST a iné antigény),
- celkové zhoršenie ukazovateľov krvného obrazu,
- pokles hladín vitamínu A v pečeni.

Dlhodobé podávanie dvoch relatívne nízkych dávok PCB brojlerovým kurčatám v krmive sa vyznačovalo širokým spektrom imunotoxických a metabolických účinkov. Charakteristický bol pitevný nález, zhoršený krvný obraz a pokles hladiny vitamínu A v pečeni. Na rozdiel od klinických príznakov popísaných u brojlerov pri hydroptickom syndróme vo veľkochovoch (J a n t o š o v i č a i., 1991) sme ascites pozorovali len výnimočne. Rovnako nedochádzalo k poklesu vitamínu E v pečeni. Za veľmi závažné možno považovať postihnutie lymfatického tkaniva. Naše výsledky o imunotoxickom pôsobení potvrdzuje i práca autorov H a - l o u z k a a J u r a j d a (1991) o synergickom účinku PCB a vírusu Markovej choroby (MDV) na intenzitu imunosupresie sledovanú na základe cytolytických zmien lymfatických orgánov kurčiat.

Literatúra:

BOBÁKOVÁ, E. - ADAMEC, O. - KOŠUTZKÝ, J. - ŠÁRNIKOVÁ, B.: Indukcia mikrozomálnych enzýmov pečene kurčiat účinkom niektorých perzistentných cudzorodých látok. *Veter. Med. (Praha)*, 23, 1978, s. 157-163.

BOBÁKOVÁ, E. - KOŠUTZKÝ, J. - ADAMEC, O.: Liver aryl 4-monooxygenase activity in the progeny of hens receiving dietary polychlorinated biphenyls. *Brit. poultr. Sci.*, 21, 1980, s. 103-106.

BOBÁKOVÁ, E. - KOŠUTZKÝ, J. - ADAMEC, O.: Zvýšená aktivita hepatálnej aryl 4-monooxygenázy u sliepok účinkom lipofilných xenobiotík. *Veter. Med. (Praha)*, 26, 1981, s. 379-384.

BRUNSTRÖM, B.: Toxicity of coplanar polychlorinated biphenyls in avian embryos. *Chemosphere*, 19, 1989, s. 765-768.

HALOUZKA, R. - JURAIDA, V.: Morphological expression of immunosuppression in poultry. *Acta Veter. (Brno)*, 60, 1991, s. 271-276.

HALOUZKA, R. - RUPRICH, J. - PISKAČ, A.: Účinek polychlorovaných bifenylů na organismus kuřat: Patologické změny orgánů po krátkodobém a dlouhodobém příjmu Deloru 103. *Veter. Med. (Praha)*, 35, 1990, s. 303-312.

HERZIG, I. - TOULOVÁ, M. - PISAŘÍKOVÁ, B. - KOČAN A. - NEUMANNOVÁ, M. - ZEŽULA, V. - MATOUŠKOVÁ, O.: Etiologie a prevence edémové nemoci drůbeže. [Závěrečná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1985. 48 s.

HOMOLKA, J.: Klinické biochemické vyšetřovací metody. Praha, Avicenum 1971. 508 s.

HRUBIŠKO, M. - HULE, V.: Hematologie a transfúze krve. Martin, Osveta 1970. 471 s.

HUDECOVÁ, A. - KOŠINOVÁ, A. - MAĐARIČ, A.: Štúdium účinkov polychlóvaných bifenylů (PCB) na obsah vitamínu A a E v pečeni experimentálnych zvierat. In: Zbor. Ref. Konf. Cudzorodé látky v požívatínach, Starý Smokovec, SVTS - Dom techniky, Košice 1977. s. 81-88.

- JANTOŠOVIČ, J. - KONRÁD, J. - ŠÁLY, J. - ŠKARDOVÁ, I. - KUŠEV, J. - BENINGHAUSOVÁ, K.: Hydroptický syndróm u kuřiat. *Veterinářství*, 41, 1991, s. 261-263.
- KOČAN, A. - PETRÍK, J. - CHOVANCOVÁ, J. - NEUBAUEROVÁ, L. - BEZAČINSKÝ, M.: PCDD, PCDF and PCB levels in stack emissions from Czecho-Slovak waste burning facilities. *Chemosphere*, 23, 1991, s. 1473-1480.
- KOŠINOVÁ, A. - MAĐARIČ, A. - HUDEC OVÁ, A.: Kombinovaný účinok Deloru 103 a vitamínu E na hepatálnu enzýmovú indukciu. In: Zbor. Ref. Konf. Cudzorodé látky v poživatinách, Starý Smokovec, SVTS - Dom techniky, Košice 1977, s. 89-99.
- KOŠUTZKÝ, J.: Biologické a ekotoxikologické faktory v reprodukci hydiny. *Poľnohosp. Veda*, ser. C, 1987, č. 2, s. 139.
- KOŠUTZKÝ, J. - ADAMEC, O. - BOBÁKOVÁ, E.: Effects of polychlorinated biphenyls on poultry reproduction. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 21, 1979, s. 737-742.
- LOPUCHOVSKÝ, J.: Interakcia cholecalciferolu s polychlorovaným bifenylo (Delor 103) u hydiny. *Biol. chem. Vet.*, 22, 1986, s. 433-439.
- PETRÍK, J. - CHOVANCOVÁ, J. - KOČAN, A. - HOLOUBEK, I.: Project TOCOEN. The fate of selected organic pollutants in the environment. VIII. PCBs in human adipose tissues from different regions of Slovakia. *Toxicol. Environ. Chem.*, 34, 1991, s. 13-18.
- PISKAČ, A. - RUPRICH, J. - HALOUZKA, R.: Účinek polychlorovaných bifenylov (PCB) na organizmus kuřat: Vliv krátkodobého příjmu vysokých dávek Deloru 103 na koncentraci thyroxinu, trijodthyroninu, sodíku, draslíku a vápníku v krevním séru. *Veter. Med. (Praha)*, 35, 1990, s. 237-246.
- RUPRICH, J. - PISKAČ, A.: Účinek polychlorovaných bifenylov (PCB) na organizmus kuřat: Vliv dlouhodobého příjmu středních dávek Deloru 103 na koncentraci thyroxinu, trijodthyroninu a celkového vápníku v krevním séru. *Veter. Med. (Praha)*, 35, 1990, s. 97-103.
- SAFE, S. - HUTZINGER, O.: Polychlorinated biphenyls (PCBs): Mammalian and environmental toxicology. Berlin, Springer-Verlag 1987. 145 s.

Došlo 19. 11. 1992

KOŠUTZKÝ, J. - KOŠUTZKÁ, E. - LENČUCHOVÁ, L. (Research Institute of Breeding Poultry, Ivanka pri Dunaji; State Veterinary Institute, Nitra):

Long-range exposure of chickens to PCB - metabolic and immunotoxic effects.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (5) : 287-296.

Even though it has been forbidden to produce and commercially use polychlorinated biphenyls (PCB) in this country, their stocks and contaminated refuses continue to be a source of danger at present. Hence prevention of environment and food chain contamination is being focused on, along with their monitoring in various commodities. In the poultry operations random contacts of poultry with PCB-containing materials may be expected (paints, plasters, litter).

In our experiment we investigated metabolic and immunotoxic effects of low PCB doses on broiler chickens. A hundred and twenty sexed straight-run chicks randomly divided themselves into three departments on deep litter. Cockerels had an *ad libitum* access to feeds and water, and they were reared under a continuous lighting regime. A feed mix BR-2 (ME 12.8 i.u., crude protein 19.9 %) was used as an experimental diet. The experimental groups received a contaminated mix (equal portions of original commercial PCB preparations - Delor 103 and Delor 105 manufactured by the firm Chemko Strážske) at doses of 5 and 50 mg/kg. Chick exposure to PCB lasted from the first to 42nd day of their life. Chick weight, relative organ weight and vitamin A and E levels

in liver were determined at the end of the experiment (42 days). The concentrations of cholesterol, triglycerides, proteins, calcium and lysozyme were determined in the blood serum. The concentrations of antibodies to chick repeated immunization with a vaccine against Newcastle disease (AVIPEST) and the blood picture of chicks were also evaluated.

Chronical PCB applications in broiler diet resulted in a significant decrease in the weight of broiler chicks at the age of 21 and 28 days ($P < 0.01$). The weight differences were compensated later on, and the chick weight of the different groups at the age of 42 days was not significantly affected by this treatment. Hepatitis and hydropericarditis were found in affected chicks at their dissection (age of 42 days). Liver weight significantly increased after administration of both PCB doses ($P < 0.01$), but the relative weight of lymphoreticular organs (thymus, spleen, bursa Fabricii) decreased ($P < 0.05$). There were serious metabolic disorders in the blood serum after 42-day PCB applications. Cholesterol and triglyceride concentrations ($P < 0.01$) were significantly increasing ($P < 0.01$), while the content of serum calcium significantly dropped (28 and 35 days of age). PCB exposed cockerels had the significantly lower titre of antibodies to repeated immunization against Newcastle disease. Immunosuppressive effects were also observed after applications of other antigens (*B. abortus*-antigen, SRBC-antigen) and after titre readings of the corresponding antibodies. A drop of lysozyme concentrations (insignificant) and worse blood picture in all the investigated parameters were found in the blood serum of PCB group chicks. The vitamin E concentrations in liver did not change, the vitamin A concentrations significantly decreased. A typical post-mortem finding (hepatitis, hydropericarditis) and a broad spectrum of clinical and metabolic disorders were observed in the PCB-exposed groups.

chickens; polychlorinated biphenyls (PCB); metabolic disorders; immunotoxic effects

Contact Address:

MVDr. Jozef Košítzký, DrSc., Výskumný ústav chovu hydiny, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic
Tel. 07 943121

FORMY XANTIN OXIDOREDUKTÁZY V TKANIVÁCH JAPONSKEJ PREPELICE

J. Jankela, M. Baranovská, J. Antalíková

Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, Ivanka pri Dunaji

Xantin oxidoreduktáza (XOR) sa v tkanivách japonskej prepelice nachádza v troch formách využívajúcich ako akceptor elektrónov NAD^+ , O_2 , metylénovú modrá (MM). V pečeni a v obličkách sa nachádzajú všetky tri formy XOR, v pankrease absentuje forma využívajúca O_2 . Pečeňová forma XOR-NAD a XOR-MM sú v lineárnej korelácii s obsahom bielkovín v krmive v rozmedzí 120 - 370 g N x 6,25/kg, v obličkách je popísaná lineárna závislosť len u formy XOR-MM.

Coturnix coturnix japonica; pečeň; obličky; pankreas; xantin oxidáza a dehydrogenáza; NAD^+ ; O_2 ; metylénová modrá; vplyv bielkovín krmiva

Xantin oxidoreduktáza (XOR) je enzým široko distribuovaný v živočíšnej ríši. U vtákov xantin oxidoreduktáza využívajúca NAD^+ účinkuje v eliminácii aminokyselínového dusíka. V pečeni vtákov je aktivita tohoto enzýmu v priamej korelácii s obsahom bielkovín v krmive (J a n k e l a , 1978). Predpokladá sa, že rovnako ako u vtákov aj u cicavcov je XOR dehydrogenázového typu. Práce autorov S t r i p e a C o r t e (1969) poukázali na to, že dehydrogenázová forma enzýmu môže byť v tkanivách cicavcov reverzibilne menená na oxidázovú formu, využívajúcu molekulárny kyslík (B a t e l l i a i., 1992). Oxidázová forma enzýmu môže teda za určitých podmienok existovať v tkanive *in vivo* (M c K e l v e y a i., 1988). Podľa autorov M a r g o l i n a B e h r m a n (1992) hodnota aktivity oxidázovej formy dosahuje až 1/3 hladiny dehydrogenázy. V prezentovanej práci sme sa pokúsili overiť či dehydrogenázová forma je jedinou formou XOR v tkanivách vtákov a ak nie, tak či korelácia medzi aktivitou a obsahom bielkovín v krmive platí aj pre iné formy enzýmu.

MATERIÁL A METÓDY

Japonské prepelice - kohútiky z chovu ÚBGŽ SAV vo veku 41 dní boli rozdelené do 5 skupín po 10 zvierat. Štyri skupiny boli kŕmené *ad libitum* dietami na báze sušeného vaječného albumínu s obsahom 0, 120, 240, 300 g N x 6,25/kg krmiva. Zloženie krmív je v tab. I. Piata skupina bola kŕmená štandardnou kŕmnom zmesou KR1 s obsahom 260 g N x 6,25/kg.

Po 10dňovom kŕmení boli zvieratá dekapitované. Okamžite po usmrtení boli pečeň, obličky a pankreas homogenizované v sklenom Potter-Elvehjemovom homogenizátore v tris-HCl tlmiacom roztoku (pH 7,4) pri teplote 4 °C. Jaderná frakcia homogenátov bola odstránená centrifugáciou po dobu 20 min (800 G, 4 °C) a mikro-

I. Zloženie experimentálnych diét — The formulae of experimental diets

Komponent ¹ (g)	Experimentálna diéta ¹⁰			
	I	II	III	IV
Sušený vaječný bielok ²	-	15,15	30,30	45,45
Kukurličný škrob ³	30,50	25,45	20,40	14,75
Glukóza ⁴	61,00	50,90	40,80	30,70
Klíčkový olej ⁵	1,0	1,0	1,0	1,0
Slnečnicový olej ⁶	2,0	2,0	2,0	2,0
Celulóza ⁷	3,0	3,0	3,0	3,0
Vitamínový doplnok ⁸	1,0	1,0	1,0	1,0
Minerálny doplnok ⁹	1,5	1,5	1,5	1,5
g N x 6,25/kg	0	120	240	370

¹ingredient, ²dried egg albumen, ³maize starch, ⁴glucose, ⁵germ oil, ⁶sunflower oil, ⁷cellulose, ⁸bio-factors supplement, ⁹mineral supplement, ¹⁰experimental diet

zomálna frakcia následnou centrifugáciou po dobu 30 min (24 000 G, 4 °C). Hrubá cytoplazmatická frakcia bola 3 h dialyzovaná oproti 200násobku tris-HCl tlmivého roztoku (pH 7,4) pri teplote 4 °C.

V dialyzátoch bol stanovený obsah celkových bielkovín podľa autorov L o w r y a i. (1951) a aktivity xantin oxidoreduktázy (EC 1.2.99.2.) pre akceptory NAD⁺, molekulárny kyslík, resp. metylénová modrá. Stanovenie dehydrogenázovej formy enzýmu (akceptor NAD⁺) bolo uskutočnené v tris-HCl tlmivom roztoku meraním tvorby NADH pri 340 nm v prítomnosti 0,015 mmol xantínu a 1,088 mmol NAD⁺. Aktivita oxidázovej formy (akceptor O₂, metylénová modrá) bola meraná v prítomnosti 0,015 mmol xantínu a 0,8 μmol metylénovej modrej, resp. pri sýtení kyslíkom na základe merania tvorby kyseliny močovej pri 292 nm.

Hodnoty špecifickej aktivity (kat/mg bielkovín) boli štatisticky vyhodnotené na preukaznosť rozdielov medzi skupinami t-testom a vplyv bielkovín krmiva na aktivitu bol testovaný lineárnou regresiou.

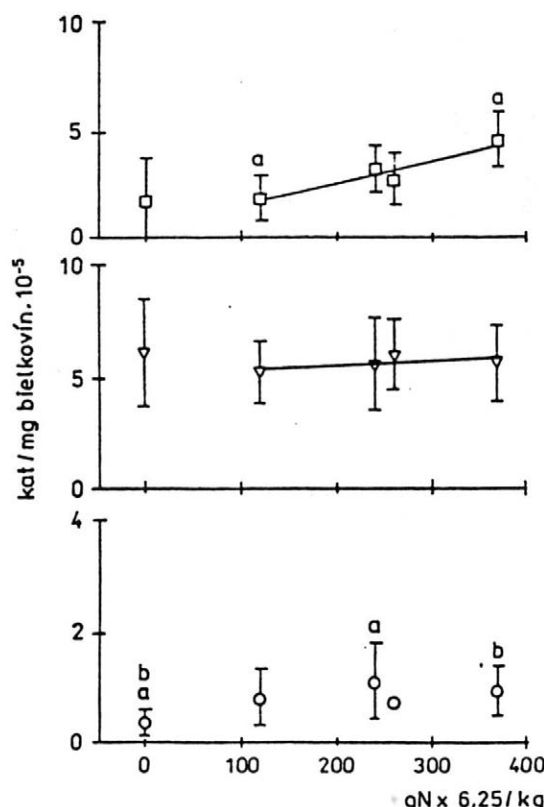
VÝSLEDKY

Špecifická aktivita XOR meraná pre akceptor NAD⁺ (XOR-NAD) je na obr. 1. Prítomnosť tejto dehydrogenázovej formy enzýmu bola zistená vo všetkých troch sledovaných orgánoch. Najvyššie špecifické aktivity boli pozorované v obličkách, najnižšie v pankrease.

Hodnoty špecifickej aktivity XOR-NAD v pečeni boli signifikantne rozdielne len medzi skupinou zvierat kŕmených diétou obsahujúcou 120 g N x 6,25/kg a zvieratami s krmivom obsahujúcim 370 g N x 6,25/kg. Regresná analýza ukázala, že v rozmedzí 120 - 370 g N x 6,25/kg je vzostup špecifickej aktivity XOR-NAD li-

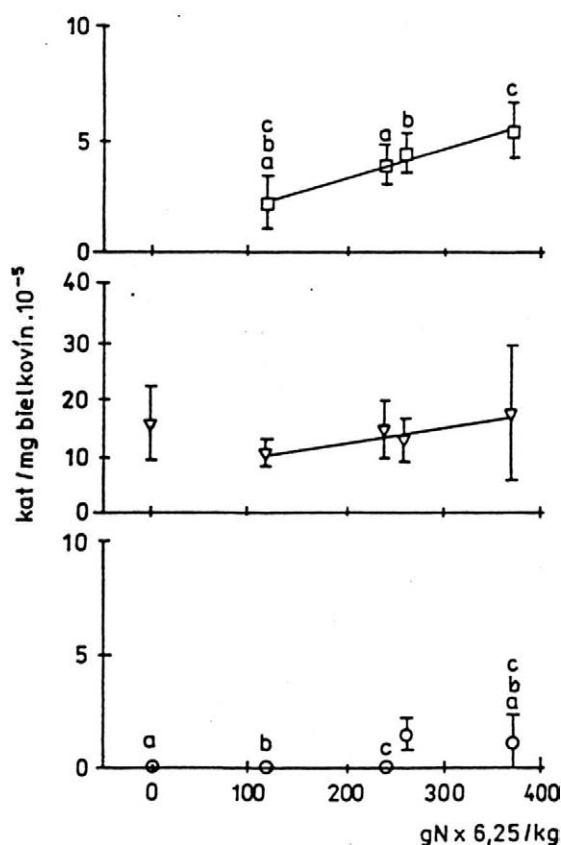
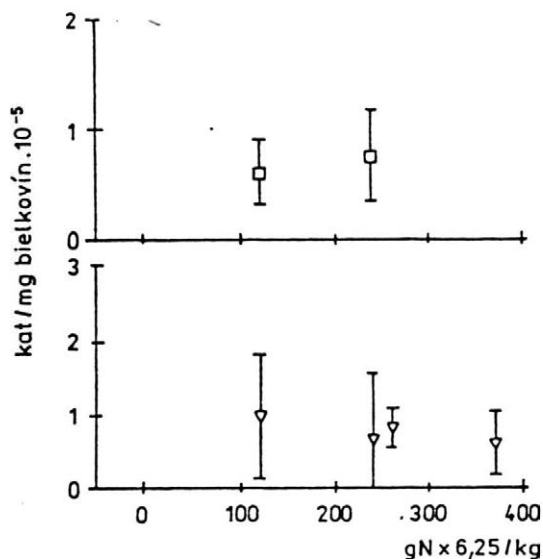
1. Špecifická aktivita XOR-NAD⁺ v pečeni □, obličkách ▽ a pankrease ○. Hodnoty s rovnakým indexom (a, b) sú štatisticky preukazné ($P < 0,05$) — Specific XOR-NAD⁺ activity liver □, kidneys ▽ and in pancreas ○. Values with the same superscript (a,b) are statistically significant ($P < 0.05$)

kat/mg bielkovín.10⁻⁵ = kat/mg proteins.10⁻⁵

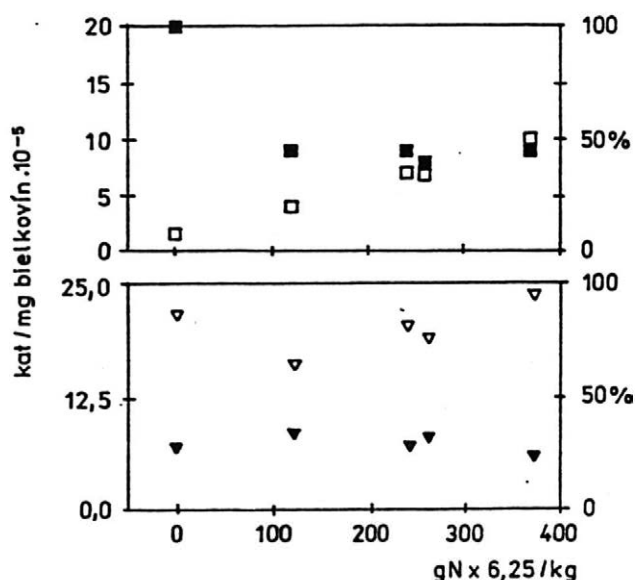


neárny (regresný koeficient ($RK = 0,962$). Linearita vzrastu aktivity v celom sledovanom rozmedzí obsahu bielkovín v krmive je o niečo slabšia ($RK = 0,923$). Hodnota špecifickej aktivity u zvierat kŕmených kontrolným krmivom (260 g N x 6,25/kg) je nižšia ako by vyplývalo z lineárneho vzťahu aktivity a obsahu bielkovín v krmive. Variabilita obličkovej špecifickej aktivity bola pomerne značná, rozdiely medzi jednotlivými skupinami neboli preukazné. Trend vzostupu aktivity pri kŕmení dietami s obsahom 120 - 370 g N x 6,25/kg nie je lineárny ($RK = 0,634$). Analýza špecifickej aktivity XOR-NAD v pankrease poukázala síce na preukazné rozdiely medzi hodnotami aktivity u zvierat kŕmených bezdušikovou diétou a zvierat kŕmených dietami s obsahom 240, resp. 370 g N x 6,25/kg, ale trendy v závislosti medzi aktivitou a hladinou dusíkatých látok v diete neboli pozorované. Podobne ako v pečeni je pozorovaný značný pokles špecifickej aktivity u zvierat kŕmených kontrolným krmivom (260 g N x 6,25/kg), pričom individuálna variabilita hodnôt je veľmi nízka ($SD = 0,13$).

Xantin oxidoreduktáza využívajúca molekulárny kyslík (obr. 2) bola zistená len v pečeni a obličkách, aj to len u niektorých skupín zvierat. Pri použití bezbielkovinovej diety nebola zistená prítomnosť tejto formy enzýmu ani v jednom orgáne, v pečeni navyše absentovala aj u zvierat kŕmených diétou s obsahom 240 a 370 g



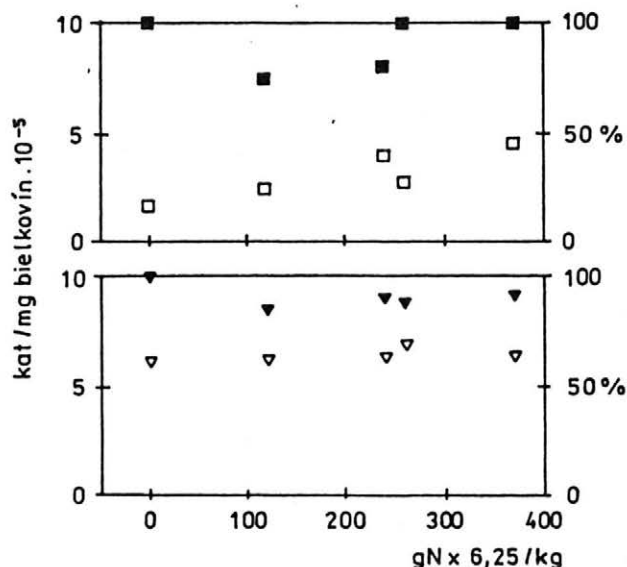
4. Sumárna aktivita XOR-NAD⁺ a XOR-MM (prázdny symbol) a percentuálny podiel dehydrogenázovej aktivity (plný symbol) v pečeni □ ■ a v obličkách ∇ ▼
 — Summary activity of XOR-NAD⁺ and XOR-MM (open symbol) and the percentage of dehydrogenase activity (solid symbol) in liver □ ■ and kidneys ∇ ▼



N x 6,25/kg. Obličková aktivita tejto formy XOR vykazovala tendenciu k poklesu v závislosti na obsahu bielkovín v krmive.

Na obr. 3 je špecifická aktivita XOR meraná pre umelý akceptor - metylénový modrý (XOR-MM). Rovnako ako v prípade XOR-NAD bola táto forma enzýmu detekovaná vo všetkých troch orgánoch s najvyššími hodnotami v obličkách a najnižšími v pankrease. V pečeni zvierat kŕmených bezbielkovinovou diétou nebola zistená prítomnosť XOR-MM. U ostatných skupín dochádzalo k prudkému, signifikantnému vzostupu špecifickej aktivity v závislosti na hladine dusíkatých látok v diete, pričom linearita tohoto vzostupu je veľmi vysoká ($RK = 0,99$). Obličková XOR-MM bola s pomerne vysokou špecifickou aktivitou stanovená u zvierat kŕmených bezbielkovinovou diétou. V rozmedzí 120 - 370 g N x 6,25/kg bol pozorovaný mierny, nepreukazný lineárny vzostup aktivity (regresný koeficient $RK = 0,939$). Pankreatický enzým využívajúci MM bol zistený u všetkých skupín zvierat s veľmi nízkou individuálnou variabilitou, najmä u zvierat kŕmených diétou s 0, 120, resp. 240 g N x 6,25/kg ($SD = 0,092, 0,063, \text{resp. } 0,086$).

Na obr. 4 sú sumarizované aktivity foriem XOR využívajúce NAD⁺ a MM ako aj percentuálny podiel dehydrogenázovej formy. Regresná analýza pečenných foriem enzýmu ukazuje na vysokú linearitu vzostupu sumárnej aktivity v závislosti na obsahu bielkovín v krmive v rozmedzí 0 - 370 g N x 6,25/kg ($RK = 0,998$). Okrem zvierat kŕmených bezbielkovinovou diétou je však podiel dehydrogenázovej formy na sumárnej aktivite len 45 %. V obličkách je zastúpenie formy XOR využívajúcej NAD⁺ len 33 %, vzostup sumárnej aktivity v rozmedzí 120 - 370 g N x 6,25/kg je však preukazateľne lineárny ($RK = 0,965$). Aktivita XOR využívajúca prirodzené akceptory NAD⁺ a molekulárny kyslík je sumarizovaná na obr. 5. Percentuálny podiel dehydrogenázovej aktivity je vysoký a neklesá pod 80 %.



5. Sumárna aktivita XOR-NAD⁺ a XOR-O₂ (prázdny symbol) a percentuálny podiel dehydrogenázovej aktivity (plný symbol) v pečeni □ ■ a v obličkách ▽ ▼
— Summary activity of XOR-NAD⁺ and XOR-O₂ (open symbol) and the percentage of dehydrogenase activity (solid symbol) in liver □ ■ and kidneys ▽ ▼

DISKUSIA

O mechanizmoch konverzie foriem XOR pojednáva niekoľko prác. Oxidáciou, alebo blokovaním tiolových skupín enzýmu dochádza k reverzibilnej premene dehydrogenázovej formy na oxidázovú (Corte a Stirpe, 1972), rovnako ako za určitých patologických podmienok (Kuppusamy a Zweier, 1989) pri zvýšenej dostupnosti purínových metabolitov (Marubayashi a i., 1991), resp. starnutím preparátu (Corte a Stirpe, 1968a), alebo inkubáciou s proteolytickými enzýmami (Corte a Stirpe, 1968b). Metodika prípravy vzorky v popísanej práci bola zvolená tak, aby sa do najnižšej miery znížili možné účinky prirodzených determinantov enzymatickej konverzie. Časový postup prípravy preparátu nepresiahol päť hodín a teda vplyv starnutia preparátu na formu XOR mohol byť zanedbateľný. Zaradenie dialyzačného stupňa malo za cieľ odstrániť natívne prítomné kofaktory, alebo iniciátory konverzie. Pri samotnom testovaní enzymatickej aktivity bol použitý akceptor NAD⁺, O₂, resp. metylénová modrá v nadbytku, teda nemohlo dôjsť k artefaktom vyplývajúcim z jeho nedostatku. Ukázalo sa, že napriek uvedeným zásadám prípravy vzorky bola hodnota špecifickej aktivity oxidázovej formy pri použití umelého akceptoru - metylénovej modrej vo väčšine prípadov vyššia ako aktivita dehydrogenázového typu.

V pečeni zvierat kŕmených bezbielkovinovou diétou nebola aktivita oxidázovej formy stanovená. U ostatných skupín zvierat prevažovala nad dehydrogenázovou formou asi 1,3-násobne. V obličkách zvierat všetkých skupín bola oxidázová forma enzýmu, využívajúca MM 2,0 - 3,1-krát vyššia ako forma využívajúca NAD⁺. Metylénová modrá ako umelý produkt sa v organizme nevyskytuje, aktivita enzýmu využívajúceho tento akceptor je teda viac menej experimentálnou záležitosťou.

Z hľadiska prirodzeného substrátu je podstatnejšia afinita XOR k molekulárnemu kyslíku. Aktivita tejto formy XOR je však detekovateľná prakticky len v obličkách a ani tu nedosahuje viac ako 18 % dehydrogenázovej aktivity. Z tohoto dôvodu možno uzatvárať, že XOR v sledovaných tkanivách vtákov je prevažne dehydrogenázového typu. Korelácia medzi obsahom bielkovín v krmive a aktivitou XOR dehydrogenázového typu bola už dokumentovaná (Jankela, 1978; Baranovská a Gažo, 1990). Linearita tohoto vzťahu v oblasti 15 - 60 % bielkovín v krmive bola popísaná pre aktivitu v pečeni, ale nie v obličkách a v pankrease.

Hodnoty aktivity u zvierat kŕmených kontrolnou kŕmnou zmesou s obsahom 260 g N x 6,25/kg sú najmä v pečeni a v pankrease mimo rozsahu hodnôt u ostatných skupín zvierat. Tento fakt môže poukazovať na vplyv nebielkovinových látok v krmive, ktoré rovnakým spôsobom ovplyvňujú pečennú a pankreatickú, ale nie obličkovú aktivitu (Jankela, 1992) a nie sú prítomné v semisyntetických dietach použitých u ostatných skupín zvierat.

Prekvapujúce sú výsledky aktivity XOR využívajúcej MM. Aktivita tejto formy enzýmu v pečeni a v obličkách citlivejšie reaguje na zmeny obsahu bielkovín v krmive. Regresná analýza poukazuje na veľkú linearitu vzťahu aktivity a obsahu kŕmnych bielkovín nielen v pečeni, ale dokonca aj v obličkách.

Z hľadiska využitia stanovenia XOR aktivity ako markeru nutričnej hodnoty krmiva preukazná výpoveď tejto metodiky význačne stúpa. Sumarizácia aktivít xantin oxidoreduktázy využívajúcej NAD^+ a MM umožní získať korelácie medzi aktivitou XOR a obsahom bielkovín v krmive v rozsahu od 0 do 370 g N x 6,25/kg.

Literatúra

- BARANOVSKÁ, M. - GAŽO, M.: Nutritívna hodnota omelkovej múčky stanovená na prepelici japonskej. *Hydinárstvo*, 25, 1990, s.109-114.
- BATTELLI, M. G. - ABBONDANZA, A. - STIRPE, F.: Effects of hypoxia and ethanol on xanthine oxidase of isolated rat hepatocytes. *Chem.-Biol. Interact.*, 83, 1992, s.73-84.
- CORTE, E. D. - STIRPE, F.: Regulation of xanthine oxidase in rat liver: Modification of the enzyme activity on storage. *Biochem. J.*, 108, 1968a, s. 427.
- CORTE, E. D. - STIRPE, F.: The regulation of rat liver xanthine oxidase: activation by proteolytic enzymes. *FEBS Letters*, 2, 1968b, s.83.
- CORTE, E. D. - STIRPE, F.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *Biochem. J.*, 126, 1972, s.739-745.
- JANKELA, J.: Regulácia XDH aktivity vo vzťahu k bielkovinovej výžive japonskej prepelice. *Bull.ČSBS a SBS*, 6, 1978, s.8-12.
- JANKELA, J.: Vplyv mastných kyselín v krmive na aktivitu xantin dehydrogenázy u prepelice japonskej. *Veter.Med. (Praha)*, 37, 1992, s.333-339.
- KUPPUSAMY, P. - ZWEIER, J. L.: Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 264, 1989, s.9880-9884.
- LANDLER, U. - JONES, H. P.: Mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *Amer. J. Physiol.*, 254, 1988, s.753-760.
- LOWRY, O. M. - ROSENBROUGH, N. J. - FARR, A. L. - RANDALL, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, s. 265.

- MARGOLIN, Y. - BEHRMAN, H. R.: Xanthine oxidase and dehydrogenase activities in rat ovarian tissues. *Amer. J. Physiol.*, 262, 1992, s.173-178.
- MARUBAYASHI, S. - DOHI, K. - YAMADA, K. - KAWASAKI, T.: Role of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat liver cell injury., *Surgery*, 110, 1991, s. 537-543.
- Mc KELVEY, T. G. - HOLLWARTH, M. E. - GRANGER, D. N. - ENGERSON, T. D. - LANDLER, U. - JONES, H. P.: Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney., *Amer. J. Physiol.*, 254, 1988, s. 753-760.
- STIRPE, F. - CORTE, E. D.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity. *J. Biol. Chem.*, 244, 1969, s. 3855-3863.

Došlo 24. 2. 1993

JANKELA, J. - BARANOVSKÁ, M. - ANTALÍKOVÁ, J. (Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji):

Xanthine oxidoreductase forms in tissues of Japanese quail.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (5) : 297-304.

The Japanese quail tissues — liver, kidney and pancreas were analysed for the presence of forms of xanthine oxidoreductase utilised cofactors NAD^+ , molecular oxygen or artificial acceptor - methylene blue, as well as for the validity of correlation between enzymatic activity and diet protein content. Four groups of animals with the experimental diets, the formulae of which are given in Tab. I, and control group with a commercial mash were fed for ten days. For enzyme preparation, the rough purification of cytoplasmic fraction with subsequent dialysis was used. The xanthine oxidoreductase utilised NAD^+ (XOR- NAD) was detected in all examined tissues (Fig. 1), whereby the correlation of enzymatic activity with diet protein content was shown only in liver, according our previous findings (Jankela; 1978; Baranovská and Gažo, 1990). The values in liver and pancreas of animals fed a commercial mash were somewhat out of the range of linearity, probably because of the presence of nonprotein substances in mash, which affected the XOR activity in these organs (Jankela, 1992). The XOR utilised O_2 (Fig. 2) was only detected in liver and kidney with certain activity in animals fed free protein diet. The percentage of this enzyme form was below 18 % of the total activity (Fig. 5). The xanthine oxidoreductase utilised methylene blue (XOR-MM) was detected in liver, kidney and pancreas (Fig. 3). The correlation of enzymatic activity with diet protein content was linear in liver and kidney. The percentage of XOR-MM activity was very high, it amounted to 55 % of the total activity (Fig. 4). The joint determination of both forms of XOR (XOR- NAD^+ and XOR-MM) may be a valuable tool for utilization of XOR activity as a marker of the nutritional value of feed.

Coturnix coturnix japonica; liver; kidneys; pancreas; xanthine oxidase and dehydrogenase; NAD^+ ; O_2 ; methylene blue; effect of feed proteins

Contact Address:

Mgr. Ján Jankela, CSc., Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV,
900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic
Tel. 07 943883, fax 07 943052

VÝSKYT AVIÁRNÍ MYKOBAKTERIÓZY U VOLNĚ ŽIJÍCÍHO PTACTVA V RŮZNÝCH EPIZOOTOLOGICKÝCH POMĚRECH TUBERKULÓZY DRŮBEŽE

K. Hejlíček, F. Tremel

Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Brno

Byl sledován vztah mezi výskytem aviární mykobakterií u volně žijícího ptactva a tuberkulózou drůbeže. Z šesti drůbežár s výskytem tuberkulózy kura domácího byly v pěti případech u ptactva prokázány mykobakterie, popř. patologickoanatomické tuberkulózní změny. Obdobně byly prokázány mykobakterie u ptáků ulovených v zemědělských závodech, v jejichž prostředí nebo okolí se vyskytovala tuberkulózní drůbež. Naproti tomu u ptáků ulovených v závodech bez tuberkulózní drůbeže, v prostředí tuberkulózy prostého velkochovu drůbeže a ve volné přírodě nebyly, s výjimkou havrana polního (*Corvus frugilegus*), prokázány mykobakterie, resp. nalezeny tuberkulózní změny. Bylo vyšetřeno 3210 jedinců náležejících k 69 zoologickým druhům. Mykobakterie byly prokázány u 37 jedinců (1,15 %) a 13 druhů (18,84 %). Patologickoanatomické tuberkulózní změny byly nalezeny u pěti jedinců (0,15 %) a dvou druhů (2,89 %). Z izolovaných kmenů 86,6 % bylo v biologickém pokusu patogenních pro kura domácího. Z výsledků lze usuzovat, že výskyt mykobakterií u volně žijícího ptactva je podmíněn přítomností tuberkulózní drůbeže jako hlavního zdroje. Přetrvávání a šíření aviárních mykobakterií v hejnech volně žijícího ptactva u nás trvale žijícího nelze předpokládat.

tuberkulóza; volně žijící ptactvo; drůbež

V údobí po eliminaci bovinní tuberkulózy výrazně získaly na významu infekce zvířat způsobené *M. avium* a atypickými mykobakteriemi. Jsou sledovány různé zdroje a cesty šíření těchto mykobakterií, jako nutný předpoklad účinné prevence a tlumení jimi způsobovaných infekcí. Hlavním zdrojem *M. avium* pro ptáky i savce je kur domácí, zejména jedinci s pokročilými formami onemocnění, kteří intenzivně kontaminují prostředí chovu. Po utlumení tuberkulózy drůbeže ve velkochovech zůstávají dnes hlavním zdrojem tuberkulózy drůbeže malochovy, v nichž se nákaza vyskytuje často dlouhodobě. Z dalších zdrojů *M. avium* se uplatňuje volně žijící ptactvo, především synantropní druhy, které přicházejí do těsného styku s hospodářskými zvířaty. Význam tohoto zdroje pro přenos aviární mykobakterií není vždy správně hodnocen, zejména epizootologické souvislosti při jeho vzniku a přetrvávání. V našich dlouholetých studiích epizootologie aviární mykobakterií jsme věnovali pozornost také různým faktorům s možným vztahem k výskytu a šíření mykobakterií volně žijícího ptactva. Jedním z nich byla tuberkulózní drůbež, resp. kur domácí.

Tuberkulóza volně žijícího ptactva byla známa již koncem minulého století. Crips (1875) v Anglii zjistil tuberkulózu u bažanta (*Phasianus colchicus*) a Sibley (1889) u sýčka (*Strix pratincta*). Od té doby byla tuberkulóza, resp.

mykobakterií, popsána u velkého počtu různých druhů volně žijících ptáků. Byly prokázány patologickoanatomické změny nebo izolovány mykobakterie z nezměněných orgánů a tkání. Literární údaje o výskytu mykobakterií a tuberkulózních změn u jednotlivých druhů volně žijících ptáků do roku 1973 shrnul Hejliček (1977). Podle něho do té doby byla nalezena mykobakterií u 59 druhů, v některých případech opakovaně různými autory. Později byla popsána mykobakterií ještě u těchto druhů volně žijících ptáků: dudek chocholatý (*Upupa epops*), datel černý (*Dryocopus martius*), strakapoud velký (*Dendrocopos major*), krkavec velký (*Corvus corax*), konipas bílý (*Motacilla alba*), sýkora sp. (*Parus sp.*), stehlík obecný (*Carduelis carduelis*) - Michaljšova (1976); konopka obecná (*Carduelis cannabina*), vlaštovka obecná (*Hirundo rustica*), krutihlav obecný (*Jynx torquilla*) - Hejliček (1977); raroh jižní (*Falco biarmicus*) - Nie aj. (1982); orel stepní (*Aquila rapax*), sokol stěhovavý (*Falco peregrinus*) - Štika (1989); roháč potápka (*Podiceps cristatus*), kolník bílý (*Platalea leucorodia*), labuť malá (*Cygnus columbianus*), labuť velká (*Cygnus olor*), berneška tmavá (*Branta bernicla*), morčák malý (*Mergus albellus*), dřemlík tundrovitý (*Falco columbarius*), lyska černá (*Fulica atra*), racek bouřní (*Larus canus*), holub doupnák (*Columba oenas*) a kalous ušatý (*Asio otus*) - Smit aj. (1987).

Pozornost byla věnována nejen výskytu mykobakterií u různých druhů ptáků. Někteří autoři vyšetřovali i obsáhlé soubory jedinců téhož druhu s cílem zjistit rozšíření nákazy v jejich populaci. Výsledky jejich vyšetření za léta 1917 - 1973 shrnul do přehledu Hejliček (1977). Podle jednotlivých druhů a lokalit činila pozitivita 0,89 - 60 %, výjimečně 100 %. V obsáhlé studii při vyšetření 999 vrabců na území Dánska Plum (1942) upozornil, že v některých lokalitách pozoroval vysoké procento výskytu onemocnění, jinde však byla hejna onemocnění zcela prostá, i když vrabci měli možnost se nakazit.

V našich dlouholetých epizootologických depistážích aviární mykobakterií jsme věnovali rovněž pozornost různým aspektům mykobakterií volně žijícího ptactva. Jedním z nich byl i výskyt mykobakterií v závislosti na epizootologické situaci tuberkulózy drůbeže v prostředí, v němž se ptáci nacházeli.

MATERIÁL A METODY

V letech 1966 - 1990 jsme vyšetřovali volně žijící ptactvo:

- v drůbežárnách s různě intenzivním rozšířením tuberkulózy,
- v zemědělských závodech s výskytem tuberkulózy drůbeže v blízkých malochovech,
- v zemědělských závodech bez výskytu malochovů drůbeže v okolí,
- ve velkokapacitní drůbežárně prosté tuberkulózy,
- ve volné přírodě bez chovů drůbeže, v zemědělské oblasti.

Ptáky jsme získávali odstřelem nebo odchycem do sítí. Po druhovém určení jsme ptáky pitvali, zjišťovali patologickoanatomický nález a kultivačně vyšetřili z každého jedince směsný vzorek z jater a sleziny. Z narostlých mykobakterií jsme zakládali subkultur a pak v biologickém pokusu na kuru domácím ověřovali patogenitu a alergenogenní vlastnosti. Celkem jsme vyšetřili 3210 jedinců náležejících k 69 zoologickým druhům (tab. I).

VÝSLEDKY

Z tab. II je patrné, že v prostředí šesti drůbežárů s výskytem tuberkulózy (a) jsme v pěti případech z volně žijících ptáků izolovali mykobakterie. Pouze v drůbežárně N., kde rok před naším vyšetřením byla obměněna původní infikovaná drůbež a zahájeno tlumení jednoroční obměnou hejna, jsme u volně žijících ptáků mykobakterie neprokázali. V ostatních pěti drůbežárnách frekvence nálezů mykobakterií u volně žijícího ptactva vcelku odpovídala epizootologické situaci, tj. nejnižší byla v drůbežárně V., kde bylo zahájeno tlumení. Naopak nejvyšší v drůbežárně T., s četnými úhyny, kde byl též prokázán jediný případ infekce s patologickoanatomickými tuberkulózními změnami. Obdobná situace byla i u volně žijících ptáků v zemědělských závodech s výskytem tuberkulózy v blízkých malochovech drůbeže (b). V závodech N.D. a P., s výskytem četných reagentů u drůbeže, byly u uloveného ptactva nalezeny mykobakterie. V závodě T., pouze s ojedinělým výskytem reagující drůbeže v obci, nebyly u ptactva mykobakterie prokázány. Bez nálezu mykobakterií byli též volně žijící ptáci ulovení v zemědělských závodech, v jejichž okolí nebyly malochovy drůbeže (c). Mykobakterie se nepodařilo prokázat ani z volně žijícího ptactva z prostředí velkokapacitní drůbežárny prosté tuberkulózy (d), i když bylo v průběhu pěti let při odloveh vyšetřeno 298 jedinců náležejících 24 druhům. V poslední skupině (e), u ptáků ulovených ve volné krajině v zemědělské oblasti, byly nalezeny patologickoanatomické změny a mykobakterie pouze v lokalitě CH. Ve všech čtyřech případech se jednalo o jedince havrana polního (*Corvus frugilegus*), který zalétá do lokality v zimním období v hojných počtech.

Z 3210 vyšetřených jedinců volně žijících ptáků náležejících k 69 zoologickým druhům (tab. I) byly mykobakterie izolovány z 37 jedinců (1,15 %) náležejících 13 druhům (18,84 %). Z druhů s větším počtem vyšetřených jedinců byl nejčastější nález mykobakterií u havrana polního (*Corvus frugilegus*) - 5,3 %, strnada obecného (*Emberiza citrinella*) - 4,4 % a vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) - 3,9 %. Patologickoanatomické změny byly nalezeny u pěti jedinců (0,15 %) náležejících dvěma druhům (2,89 %), a to u havrana polního (*Corvus frugilegus*) - 5,4 % a vrabce domácího (*Passer domesticus*) - 0,06 %.

Z izolovaných kmenů mykobakterií sledovaných v biologickém pokusu bylo 86,6 % patogenních pro kura domácího. Vybrané kmeny byly ve všech případech typizovány jako *M. avium*, sérotyp 2.

DISKUSE

V epizootologii aviární mykobakterií má prvořadý význam poznání zdrojů *M. avium*. Za nejzávažnější zdroj je považován kur domácí. Z dalších aviárních zdrojů je věnována značná pozornost volně žijícímu ptactvu. Je k dispozici velké množství zpráv o výskytu infekce různých druhů volně žijících ptáků a stejně tak je známa rozdílná vnímavost jednotlivých druhů k *M. avium*. Při vyšetřování i téhož druhu ptáků z různých lokalit je zjišťován různý stupeň postižení mykobakterií. Na to upozornil již P l u m (1942) v Dánsku. Vzniká otázka jak si tento jev vysvětlit. Zda infekce přetrvává a šíří se v hejnech volně žijícího ptactva nebo zda

I. Přehled vyšetřených druhů a jedinců volně žijícího ptactva v jednotlivých lokalitách a nálezy mykobakterií, popř. patologickoanatomických tuberkulózních změn — A survey of examined species and individuals of free-living birds at the different localities and findings of mycobacteria, and/or patho-anatomic tuberculosis lesions

[illegible]

Druh ¹	Lokalita ²														Celkem ³
	H	V	M	K	T	N	N D	P	T	M	S	V	CH	B	
Chocholouš obecný (<i>Galerida cristata</i>)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Jíkavec (<i>Fringilla montifringilla</i>)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Jička obecná (<i>Delichon urbica</i>)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	9
Káně lesní (<i>Buteo buteo</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3
Kavka obecná (<i>Corvus monedula</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5
Konipas bílý (<i>Motacilla alba</i>)	0	4	1	0	0	0	0	1	0	0	0	16	4	16	42
Konipas horský (<i>Motacilla cinerea</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Konipas luční (<i>Motacilla flava</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4
Konopka obecná (<i>Carduelis cannabina</i>)	1	1	0	0	0	0	1/1	0	0	0	0	2	1	1	7/1 (14,3%)
Koroptev polní (<i>Perdix perdix</i>)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Kos černý (<i>Turdus merula</i>)	4	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	14	20	8	50
Králíček obecný (<i>Regulus regulus</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Králíček ohnivý (<i>Regulus ignicapillus</i>)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Kruhlav obecný (<i>Jynx torquilla</i>)	3/1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5/1 (20,0%)
Křivka obecná (<i>Loxia curvirostra</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Lejsek šedý (<i>Muscicapa striata</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Linduška lesní (<i>Anthus trivialis</i>)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3
Linduška luční (<i>Anthus pratensis</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Mlynářík dlouhoocasý (<i>Aegithalos caudatus</i>)	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Pěnice černohlavá (<i>Sylvia atricapilla</i>)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	12
Pěnice hnědokřídla (<i>Sylvia communis</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3	7

Pokračování tab. I

Druh ¹	Lokalita ²														Celkem ³
	H	V	M	K	T	N	ND	P	T	M	S	V	CH	B	
Pěnice polní (Sylvia curruca)	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	4
Pěnice slavíková (Sylvia borin)	2/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	5/1 (20,0%)
Pěnice vlašská (Sylvia nisoria)	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Pěnkava obecná (Fringilla coelebs)	3	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	18	6	15	45
Pěvuška modrá (Prunella modularis)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
Puštík obecný (Strix aluco)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Racek chechtavý (Larus ridibundus)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	17
Rákosník obecný (Acrocephalus scirpaceus)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Rákosník zpěvný (Acrocephalus palustris)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Rehek domácí (Phoenicurus ochruros)	2	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	10	16	10	42
Rehek zahradní (Phoenicurus phoenicurus)	1/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	9	12/1 (8,3%)
Skřivan polní (Alauda arvensis)	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	6
Sojka obecná (Garrulus glandarius)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
Stehlík obecný (Carduelis carduelis)	0	9	7/1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	10	12	39/1 (2,6%)
Strakapoud velký (Dendrocopos major)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	4
Strnad obecný (Emberiza citrinella)	4/1	6/1	6/2	0	0	1	0	0	0	0	0	6	12	55	90/4 (4,4%)
Strnad rákosní (Emberiza schoeniclus)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4
Sýkora babka (Parus palustris)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
Sýkora koňadra (Parus major)	7	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	42	17	19	92

Druh ¹	Lokalita ²														Celkem ³
	H	V	M	K	T	N	N D	P	T	M	S	V	CH	B	
Sýkora modřinka (<i>Parus coeruleus</i>)	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	15	11	38
Sýkora úhelničková (<i>Parus ater</i>)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Špaček obecný (<i>Sturnus vulgaris</i>)	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	9	8	21
Šoupálek dlouhoprstý (<i>Certhia familiaris</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Šoupálek krátkoprstý (<i>Certhia brachydactyla</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Ťuhák obecný (<i>Lanius collurio</i>)	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	8
Vlaštovka obecná (<i>Hirundo rustica</i>)	5/1	10	0	0	0	0	3/1	5/1	0	0	2	1	21	30	77/3 (3,9%)
Vrabc domácí (<i>Passer domesticus</i>)	50/1	21/1	47/1	28/3	1/1	19	12/1	4	8	25	9	121	530	725	1600/8 (0,5%)
Vrabc polní (<i>Passer montanus</i>)	53/6	36/2	32/1	0	1/1	35	2	0	2	0	0	26	174	87	448/10 (2,2%)
Zvonek zelený (<i>Carduelis chloris</i>)	5	11	1	0	0	0	2/1	0	0	0	0	5	4	31	59/1 (1,7%)
Zvonohlík zahradní (<i>Serinus serinus</i>)	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2	19	30
Žluna zelená (<i>Picus viridis</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Žluva hajní (<i>Oriolus oriolus</i>)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Vyšetřeno celkem ⁴	179	136	110	30	4	67	20	14	13	25	11	298	1193	1110	3210
S nálezem mykobakterií ⁵	13	5	5	3	2	0	4	1	0	0	0	0	4	0	37 (1,15%)

vyšetřeno jedinců/z toho s nálezem mykobakterií — individuals examined/individuals among these with mycobacterium findings

* nález patologickoanatomických tuberkulózních změn — finding of patho-anatomic tuberculosis lesions

¹species, ²locality, ³total, ⁴examined in total, ⁵with mycobacterium findings

II. Výskyt mykobakterií a patologickoanatomických tuberkulózních (P.A. tbc) změn u volně žijícího ptactva v různých epizootologických poměrech tuberkulózy drůbeže — The occurrence of mycobacteria and patho-anatomic tuberculosis lesions (P.A.tbc) in free-living birds at different epizootological situation of poultry tuberculosis

Lokalita ¹	Rok vyšetření ² Počet odstřelů ³	Epizootologická charakteristika ⁴	Uloveno a vyšetřeno ptáků ⁵			Uloveno a vyšetřeno druhů ⁶		
			počet ⁷	nález mykobakterií ⁸	P.A.tbc změn ⁹	počet ⁷	nález mykobakterií ⁸	P.A.tbc změn ⁹
a) drůbežárny s výskytem tuberkulózy ¹⁰								
H	1966-1968 11	41,2% reagentů na tuberkulín, výskyt klinických forem ¹¹	179	13 (7,2 %)	0	32	8 (25 %)	0
V	1966-1968 11	38 % reagentů na tuberkulín, zahájení tlumení ¹²	136	5 (3,6 %)	0	28	4 (14,3 %)	0
M	1967-1968 5	nákaza zjišťována několik let, výskyt pokročilých forem ¹³	110	5 (4,5 %)	0	13	4 (30,7 %)	0
K	1966 3	nákaza zjišťována několik let, výskyt pokročilých forem ¹³	30	3 (10 %)	0	3	1 (33,3 %)	0
T	1966 2	časté klinické formy, 3-5 úhynů denně, drůbežárna před likvidací ¹⁴	4	2 (50 %)	1 (25 %)	4	2 (50 %)	1 (25%)
N	1966-1967 4	v r.1965 24% reagentů, po obměně hejna v r.1966 a 1967 2% a 0,8% reagentů ¹⁵	67	0	0	7	0	0
			526	28 (5,3 %)	1 (0,2 %)			

Lokalita ¹	Rok vyšetření ² Počet odstřelů ³	Epizootologická charakteristika ⁴	Uloveno a vyšetřeno ptáků ⁵			Uloveno a vyšetřeno druhů ⁶		
			počet ⁷	nález mykobakterií ⁸	P.A.tbc změn ⁹	počet ⁷	nález mykobakterií ⁸	P.A.tbc změn ⁹
b) zemědělské závody s výskytem tuberkulózy drůbeže v blízkých malochovech ¹⁶								
ND	1966 4	četní reagenti v sousedících malochovech drůbeže ¹⁷	20	4 (20 %)	0	5	4 (80 %)	0
P	1966 1	reagenti v malochovech drůbeže uvnitř zemědělského závodu ¹⁸	14	1 (7,1 %)	0	5	1 (20 %)	0
T	1966 1	v celé obci v malochovech drůbeže jen ojedinělí reagenti ¹⁹	13	0	0	4	0	0
			47	5 (10,6 %)	0			
c) zemědělské závody bez malochovů drůbeže v okolí ²⁰								
M	1967 2	drůbež v blízkosti zemědělského závodu není chována ²¹	25	0	0	1	0	0
S	1967 1	drůbež v blízkosti zemědělského závodu není chována ²¹	11	0	0	2	0	0
			36	0	0			
d) velkokapacitní drůbežárna prosta tuberkulózy ²²								
V	1986-1990 19	drůbežárna pro 120 000 nosnic prosta tuberkulózy ²³	298	0	0	24	0	0
			298	0	0			

Pokračování tab. II

Lokalita ¹	Rok vyšetření ² Počet odstřelů ³	Epizootologická charakteristika ⁴	Uloveno a vyšetřeno ptáků ⁵			Uloveno a vyšetřeno druhů ⁶		
			počet ⁷	nález mykobakterií ⁸	P.A.tbc změn ⁹	počet ⁷	nález mykobakterií ⁸	P.A.tbc změn ⁹
e) volná krajina v zemědělské oblasti ²⁴								
CH	1977-1980 19	stavební místo pro velkokapacitní kravín ²⁵	618	2 (0,3 %)	2 (0,3 %)	38	1 (2,6 %)	1 (2,6 %)
	1981-1984 20		575	2 (0,3 %)	2 (0,3 %)	36	1 (2,7 %)	1 (2,7 %)
B	1977-1980 19	stavební místo pro velkokapacitní kravín ²⁵	547	0	0	30	0	0
	1981-1984 20		563	0	0	24	0	0
			2303	4 (0,17 %)	4 (0,17 %)			
			3210	37 (1,15 %)	5 (0,15 %)			

¹locality, ²year of examination, ³number of deadshot birds, ⁴epizootological characteristics, ⁵birds caught and examined, ⁶species caught and examined, ⁷number, ⁸mycobacterium finding, ⁹P.A.tbc, ¹⁰a) poultry farms with tuberculosis occurrence, ¹¹41.2 % of reactors to tuberculin, occurrence of clinical forms, ¹²38 % of reactors to tuberculin, outset of attenuation, ¹³infection found out several years, occurrence of advanced forms, ¹⁴frequently occurring clinical forms, 3-5 deaths a day, poultry farm facing the liquidation, ¹⁵24 % of reactors in 1965, 2 % and 0.8 % of reactors in 1966 and 1967 after flock exchange, ¹⁶b) agribusiness enterprises with poultry tuberculosis occurrence on near small farms, ¹⁷frequent reactors on the neighbouring small poultry farms, ¹⁸reactors in small flocks within an agribusiness enterprise, ¹⁹only single reactors on small poultry farms in the whole village, ²⁰c) agribusiness enterprises without small poultry farms in the vicinity, ²¹no poultry is reared in the proximity of agribusiness enterprise, ²²d) large-capacity poultry farm free of tuberculosis, ²³poultry farm for 120,000 laying hens free of tuberculosis, ²⁴e) open landscape in the agricultural area, ²⁵construction site for a large-capacity cow-house

se ptáci musí infikovat z primárního zdroje, tj. nejčastěji od tuberkulózní drůbeže, resp. kura domácího. Této otázce jsme věnovali pozornost v rámci našich dlouholetých epizootologických depistáží aviární mykobakterií. Výsledky, jichž jsme dosáhli, ukazují na těsnou souvislost mezi výskytem *M. avium* u volně žijících ptáků a přítomností tuberkulózní drůbeže v prostředí zemědělského závodu a okolí. To jsme mohli potvrdit u ptáků ulovených v tuberkulózních drůbežárnách, kde i rozsah a pokročilost nákazy u drůbeže se projevila v intenzitě mykobakteriální infekce u volně žijícího ptactva. To dokazuje i příklad drůbežárny N., kde bylo zahájeno tlumení tuberkulózy drůbeže a tedy se výrazně zmenšila kontaminace prostředí mykobakteriemi. Tam u ptactva mykobakterie nalezeny nebyly. Naopak v drůbežárně T., kde nebyla konána ani minimální opatření, jako odstranění klinicky nemocné drůbeže, byla zjištěna u jednoho vrabce domácího (*Passer domesticus*) generalizovaná tuberkulóza. Stejná pozorování byla učiněna i při vyšetření volně žijících ptáků v zemědělských závodech, kde byl zjišťován možný zdroj aviární tuberkulózy pro skot, popř. prasata. I tam byl nález mykobakterií u ptactva určován výskytem tuberkulózy, resp. reagentů na tuberkulín u drůbeže v malochovech, stejně jako situováním těchto malochovů ve vztahu k zemědělskému závodu. Negativní výsledek vyšetření byl i v prostředí, kde drůbež nebyla chována a až na výjimky i u ptáků z volné krajiny. Jediný výskyt tuberkulózy v této skupině (e) se vztahuje k havranu polnímu (*Corvus frugilegus*), který však u nás pouze zimuje a lze předpokládat, že se infikuje v jiných lokalitách. Nebezpečí mykobakteriální infekce je u něj potencováno i velmi pestrá skladbou potravy. Naše předpoklady potvrzuje i negativní vyšetření ptáků z prostředí velkokapacitní drůbežárny prosté tuberkulózy, konané v různých ročních obdobích po dobu pěti let. Lze tedy výsledky našich vyšetření shrnout v tom, že v našich poměrech výskyt mykobakterií, resp. tuberkulózních změn, u volně žijícího ptactva je podmíněn přítomností zdrojů *M. avium* v chovech drůbeže. Tam se ptáci infikují a mohou původce dále šířit. Přenos uvnitř hejn volně žijícího ptactva zřejmě nenastává, především pro značnou prostorovou disperzi a většinou krátkověkost nejčastěji se vyskytujících synantropních druhů, která je případnou mykobakteriální infekcí ještě snížena. Výjimku v tomto směru činí havran polní (*Corvus frugilegus*), migrující druh, který má možnost se nakazit v různém prostředí, a to opakovaně po řadu let. Proto je tomuto druhu, jako zdroji *M. avium*, nutno věnovat zvýšenou pozornost. Nelze tedy význam volně žijících ptáků jako zdroje *M. avium* podceňovat, na druhé straně se však zřejmě jedná o vedlejší zdroj, jehož existence je vázána na zdroj hlavní, tj. především tuberkulózního kura domácího.

Literatura

CRISP, E.: Tubercle in twenty one pheasants. J. Path. Soc., 26, 1875, s. 249 - 251. In: FELDMAN, W. H.: Avian tuberculosis infections. 1938, s. 223 - 245.

- HEJLÍČEK, K.: Epizootologie aviární tuberkulózy. [Doktorská disertace.] Brno, 1977. 140 s. - Vysoká škola veterinární.
- MICHAJLOVA, K. I.: Dikije ptici - istočnik tuberkuljoznoj infekcii. Tr. Nauč. - issled. Inst. Tadž. SSR, 6, 1976, s. 35 - 39.
- NIE, G. J. van - LUMEIJ, J. T. - DORRESTEIN, C. M.: Tuberculose bij roofvogels. I. Casuistiek en differentiele diagnose. T. Diergeneesk., 107, 1982, s. 563 - 572.
- PLUM, N.: Studies on the occurrence of avian tuberculosis among wild birds, especially gulls and sparrows, and in rats and hares. Skand. Veter. Tidskr., 32, 1942, s. 465 - 487.
- SIBLEY, W. K.: Tuberculosis in vertebrates. J. comp. Med. Surg., 10, 1889, s. 318 - 331. In: FELDMAN, W. H.: Avian tuberculosis infections. 1938, s. 223 - 245.
- SMIT, T. - EGER, A. - HAAGSMA, J. - BAKHUIZEN, T.: Avian tuberculosis in wild birds in the Netherlands. J. Wildl. Diseases, 23, 1987, s. 485-487.
- ŠTIKA, V.: Tuberkulóza denních dravců. Veterinářství, 39, 1989, s. 86-88.

Došlo 26. 11. 1992

HEJLÍČEK, K. - TREML, F. (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno):
The occurrence of avian mycobacteriosis in free-living birds at different epizootological situation of poultry tuberculosis.
 Vet.Med. - Czech, 38, 1993 (5) : 305-317.

The occurrence of tuberculosis in free-living birds was studied in relation to a certain epidemiological situation in a long-term study from 1966 to 1990. A total of 3210 birds were examined. Mycobacteria were isolated in five cases from free-living birds in the environment of six poultry rearing farms where tuberculosis was found in domestic fowl. At individual localities, the occurrence of mycobacteria was 3.5 - 50.0 %. Generalized tuberculosis was found in one case in house sparrow (*Passer domesticus*). On the investigated poultry rearing farms, the distribution of tuberculosis infection in free-living birds was directly related to the distribution and stage of tuberculosis in poultry or to the achieved extent of eradication. On a poultry rearing farm where no mycobacteria were isolated from free-living birds, a successful eradication of tuberculosis by flock exchange was in progress. During the examination of free-living birds on three farms, mycobacteria were found at two localities where poultry infected with tuberculosis was kept either on the farm or in its immediate vicinity. On the third farm, where no mycobacteria were found in free-living birds, only sporadic reactors to tuberculin were found during survey in spatially separated flocks. No mycobacteria were isolated from birds examined on two farms in whose vicinity poultry was not reared at all. Similarly, bacteriological cultures were negative in a group of 298 birds examined during five years in the environment of a poultry enterprise farm free from tuberculosis. No mycobacteria were found in a large group of 2303 free-living birds taken in the wild except four rooks (*Corvus frugilegus*). However, this is a migratory species which is noted for its considerable longevity. It is thus more probable that these birds were infected outside the locality which the specimens were taken from.

Out of the isolated strains of mycobacteria that were further examined by a biological experiment, 86.6 % were pathogenic to domestic fowl, serotype *M. avium* 2.

The results of these examinations suggest that the presence of tuberculosis-infected poultry as a major source of *M. avium* is necessary for the infection of free-living birds. The infectious agent apparently does not persist and spread within the flocks of free-living birds.

tuberculosis; free-living birds; poultry

Contact Address:

Doc. MVDr. František T r e m l, CSc., Vysoká škola veterinární a farmaceutická,
Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic
Tel. 05 7110

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 jeho 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 nejnižší 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 kdokoliv 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 (verzátkami), 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**



Vilček Š.: <i>In vitro</i> amplifikácia fragmentu genómu vírusu slizničnej choroby (BVD-MD) PCR metódou — <i>In vitro</i> amplification of genome fragment of bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD) by PCR method	257
Lauková A.: Antagonistická aktivita bachorových baktérií <i>Enterococcus faecium</i> a <i>Staphylococcus warneri</i> — Antagonistic activities of the rumen bacteria <i>Enterococcus faecium</i> and <i>Staphylococcus warneri</i>	267
Bomba A., Žitňan R., Koniarová I., Stachová M., Kolodzieyski L., Feješ J., Lenárt J.: Stimulácia bachorovej fermentácie cicajúcich jahniat — Stimulation of rumen fermentation in sucking lambs	275
Košutský J., Košutská E., Lenčuchová L.: Dlhodobá expozícia brojlerových kurčiat PCB - metabolické a imunologické účinky — Long-range exposure of chickens to PCB - metabolic and immunotoxic effects.	287
Jankela J., Baranovská M., Antalíková J.: Formy xantin oxidoreduktázy v tkanivách japonskej prepelice — Xanthine oxidoreductase forms in tissues of Japanese quail	297
Hejliček K., Tremel F.: Výskyt mykobakteriôzy u voľne žijícího ptactva v rôznych epizootologických poměrech tuberkulózy drůbeže — The occurrence of mycobacteriosis in free-living birds at different epizootological situation of poultry tuberculosis	305

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.