

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

6

ROČNÍK 38 (LXVI)
PRAHA 1993
ISSN 0375-8427

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
SLOVENSKÁ AKADEMIA PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

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

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

Editorial Board - Redakční rada

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

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

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

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

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

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

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

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

Editor in Chief - Vedoucí redaktorka

Ing. Zdenka Radošová

STEROIDNÁ DOMINANCIA, ENZYMATICKÁ AKTIVITA A MORFOLOGICKÝ VZHLAD BUNIEK GRANULÓZY NAJVÄČŠÍCH FOLIKULOV KRÁV

L. Lazár¹, L. Kolodzieyski²

¹Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice

²Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

Porovnávali sa koncentrácie 17 beta-estradiolu a progesterónu vo folikulovej tekutine najväčších folikulov kráv s morfológickým stavom steny folikulov posúdených rastrovacou elektrónovou mikroskopiou a enzymatickou aktivitou nešpecifickej esterázy a kyslej fosfatázy buniek folikulov. Priemerné koncentrácie 17 beta-estradiolu, estrogén dominantných folikulov ($n = 12$) boli $2173,0 \pm 1605,0$ nmol/l, zatiaľ čo progesterónu $260,1 \pm 69,1$ nmol/l. Priemerne koncentrácie 17 beta-estradiolu v progesterón dominantných folikulov ($n = 22$) boli $225,8 \pm 130,7$ nmol/l a progesterónu $2121,7 \pm 675,5$ nmol/l. Enzymatická aktivita ako kyslej fosfatázy aj nešpecifickej esterázy bola výrazná v bunkách granulózy progesterón dominantných folikulov, pri progesterón dominantných folikulov s vysokými koncentraciami progesterónu veľmi výrazná. Pri estrogén dominantných folikulov sa v niektorých prípadoch zistila nízka aktivita týchto enzýmov, hlavne vo folikuloch, kde index podielu medzi progesterónom a estradiolom sa blížil ku koeficientu 0,8. Pri rastrovacej elektrónovej mikroskopii sa pozorovala uniformita veľkosti folikulárnych buniek pri výraznej estrogénovej dominancii folikulov. S pribúdaním koncentrácií progesterónu vo folikulárnej tekutine sa zistil výskyt väčšieho počtu menších buniek pravdepodobne pyknotických. Pri výraznej luteinizácii sa pozorovala prítomnosť veľkého počtu mikroklkov na bunkách granulózy. Z výsledkov vyplýva úzky vzťah medzi zmenami koncentrácií steroidov vo folikulárnej tekutine a zmenami v enzymatickej aktivite folikulárnych buniek a morfológického vzhľadu steny folikulov.

krava; folikul; progesterón; 17 beta-estradiol; kyslá fosfatáza; nešpecifická esteráza; rastrovacia elektrónová mikroskopia

Cyklická povaha reprodukčných procesov samíc je do značnej miery závislá na jedinečnej kapacite ovariálnych folikulov zmeniť štruktúru a funkcie. Proces diferenciácie počas folikulogenézy prebieha vo všetkých častiach folikulu. Bunky granulózy odrážajú vysoký stupeň štruktúrnych zmien a hrajú kľúčovú úlohu pri funkčnom zrení neporušeného folikulu. Zmeny v reakcii na endokrinné a parakrinné vplyvy vytvárajú unikátne prostredie, ktoré je nevyhnutne potrebné pre rast oocyty a ovuláciu, čo je dosiahnuté zmenami biochemickej aktivity a vnútorného anatomickeho vzájomného vzťahu folikulu (L i n d e r a i., 1976; H s u e h , 1986).

Celý tento proces rastu a diferenciácie je závislý na gonadotropnej stimulácii folikulov a kvantite receptorových miest schopných ich viazať. Gonadotropíny cez

receptorový systém buniek granulózy aktivizujú adenylát cyklázový systém, čo vedie ku syntéze intracelulárneho druhého posla cAMP. V dôsledku pôsobenia cAMP dochádza ku syntéze steroidov, hlavne 17 beta-estradiolu, ktorý má povahu autokrinného regulátora rastu folikulov (R i c h a r d s , 1980; H s u e h a i ., 1984) a spolu s FSH, inzulínom, inzulínu podobným rastovým faktorom a inými rastovými faktormi je nevyhnutný pri tvorbe receptorových miest pre LH (E r i c k s o n , 1986; D r i a n c o u r t , 1991). Je tiež účinným mitogénym faktorom pre bunky granulózy (H i s a w , 1947). Progesterón, glukokortikoidy, prolaktín a iné faktory naopak tieto pochody vo folikuloch brzdia (M c N e i l l y a i ., 1982; S c h o o - m a k e r a i ., 1983; S c h r e i b e r , 1980).

Cieľom práce bolo porovnať koncentrácie 17 beta-estradiolu a progesterónu vo folikulárnej tekutine najväčších folikulov kráv s morfológickým stavom stien folikulov, konkrétne membrána granulóza, ako aj enzymatickú aktivitu alkalické fosfatázy a nešpecifickej esterázy ako markerov katabolyckých pochodov vo folikuloch.

MATERIÁL A METÓDY

Vaječníky sa získali na bitútku od 34 kusov náhodne vybraných kráv kríženiek SS x NČS. Folikulárna tekutina pre stanovenie koncentrácií 17 beta-estradiolu a progesterónu sa odoberala aspiráciou najväčších folikulov. Centrifugovala sa pri otáčkach 3000 G a uložila do mrazničky pri - 18 °C. Časť steny folikulu sa vystrihla a fixovala pre posúdenie rastrovacou elektrónovou mikroskopiou. Tiež sa z folikulov urobili stery na podložné sklíčka pre posúdenie enzymatickej aktivity folikulárných buniek membrána granulóza.

Koncentrácie 17 beta-estradiolu a progesterónu sa stanovili RIA súpravami z ÚRVJT Košice typového označenia RIA-test-ESTRA (SI-125-129), resp. RIA-test-Prog (SI-125-6). Folikulárna tekutina sa riedila 1,5% hovädzím gamaglobulínom. Intra- a inter-assay koeficient variácie použitých metód pre 17 beta-estradiol RIA súpravy bola 10,1 a 13,3 %, pre progesterón RIA-súpravy 11,4 % a 13,7 %.

Na určenie steroidnej dominancie folikulov sa použila metóda C a l l e s e n a a i . (1986) založená na vyjadrení vzájomného indexu podielu medzi koncentraciami progesterónu a 17 beta-estradiolu. Folikuly s indexom podielu koncentrácií menším ako 0,8 sa považovali za estrogén dominantné, v rozpätí od 0,8 do 1,2 za folikuly v prechodnej fáze vývoja a s indexom nad 1,2 za folikuly progesterón dominantné.

Rastrovacia elektrónová mikroskopia sa robila z excízií stien folikulov po vystrihnutí a opláchnutí kakodylátovým pufrom. Tieto sa fixovali v zmesi 2,5% glutaraldehydu a 2% paraformaldehydu a postfixovali v 1% rozpustnom 0,125 Mol kakodylátovom puffri. Odvodňovali sa vzostupným radom etanolu. Vysušili kritickým bodom CO₂ (polarom), pokovili zlatom o hrúbke 20 µm JEOP (JFC 1100) a pozorovali v elektrónovom mikroskope JEOP 1200 MX pri urýchľovacom napätí 20 kV.

Posúdenie enzymatickej aktivity sa robilo na steroch z granulóznych buniek, kde sa dokazovala aktivita kyslej fosfatázy a nešpecifickej esterázy inkubáciou v inkubačných médiách podľa autorov L o j d a a i . (1979). Po inkubácii sa steny opláchlili destilovanou vodou, fixovali formalínom, zaliali do glycerín želatíny a pozorovali svetelným mikroskopom (Carl-Zeiss Jena). Koncentrácie steroidov sú uvádzané v nmol/l ± SEM.

VÝSLEDKY

Priemerné koncentrácie 17 beta-estradiolu v estrogén dominantných folikuloch ($n = 12$) boli $2170,0 \pm 1605,3$ nmol/l, pričom individuálne koncentrácie sa pohybovali od 170,0 do 10180,0 nmol/l. Priemerné koncentrácie progesterónu boli v týchto folikuloch $260,1 \pm 69,1$ nmol/l pri individuálnych koncentráciách od 98,9 do 473,7 nmol/l.

Priemerné koncentrácie 17 beta-estradiolu v progesterón dominantných folikuloch ($n = 22$) boli $225,8 \pm 130,7$ nmol/l, pri individuálnom rozpätí od 1,7 do 1118,0 nmol/l. Priemerné koncentrácie progesterónu v tých istých folikuloch boli $2121,7 \pm 685,5$ nmol/l pri individuálnych koncentráciách od 225,2 do 5729,4 nmol/l.

Folikuly v prechodnej fáze vývoja sme v experimente nezaznamenali.

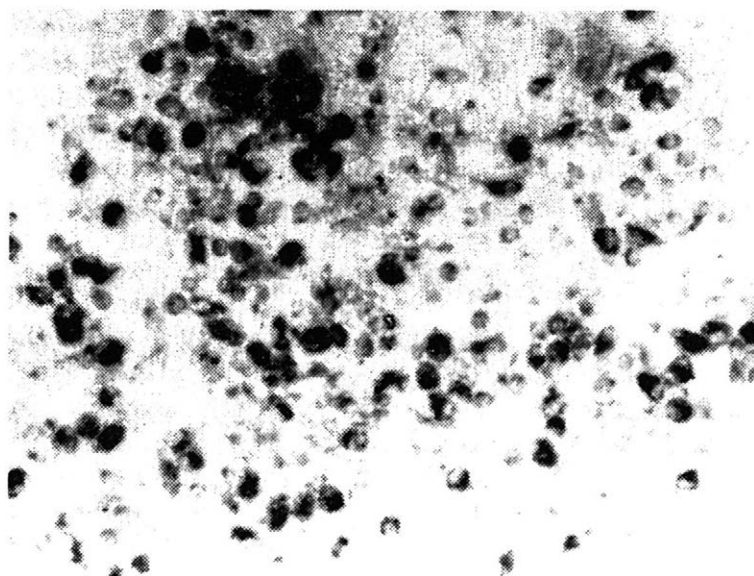
Enzymatická aktivita kyslej fosfatázy ako aj nešpecifickej esterázy bola výrazná hlavne pri bunkách granulózy, pochádzajúcich z progesterónu dominantných folikulov. Intenzita zafarbenia sa pohybovala v rozpätí od + do +++ krížikov (obr. 1 a 2). Pri estrogén dominantných folikuloch sa v bunkách granulózy niektorých folikulov tiež zistila nízka aktivita oboch sledovaných enzýmov na + krížik, hlavne vo folikuloch so zvýšenými koncentraciami progesterónu (obr. 3 a 4), keď index pomeru medzi progesterónom a estradiolom sa blížil k hodnote 0,8.

Pri výraznej estrogénnej dominancii folikulov sa rastrovacou elektrónovou mikroskopiou zisťovala výrazná uniformná veľkosť buniek membrana granulóza (obr. 5 a 6). So zisteným nárastom koncentrácií progesterónu vo folikulárnej tekutine sa pozoroval výskyt väčšieho počtu menších svetlých buniek pyknotických (obr. 7 a 8). Pri výraznej luteinizácii folikulov sa pozorovala prítomnosť veľkého počtu mikrokľkov na bunkách granulózy (obr. 9 a 10).

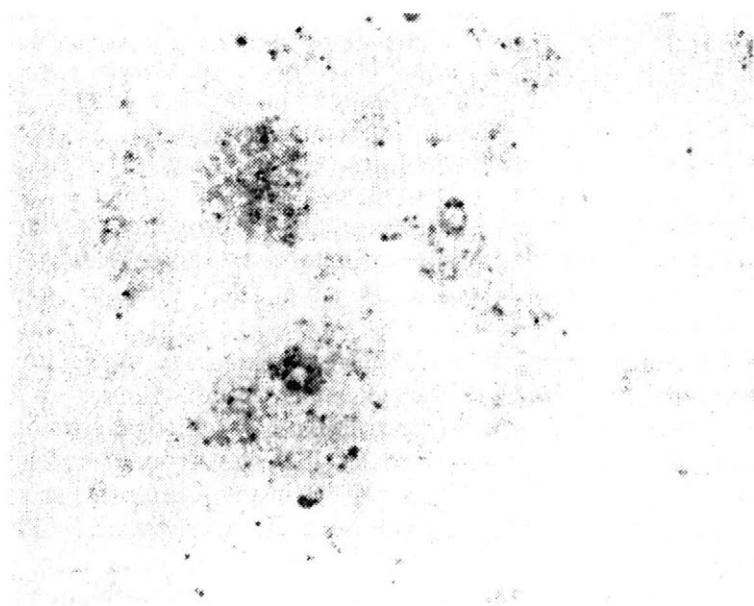
DISKUSIA

Zistenie zmien koncentrácií 17 beta-estradiolu a progesterónu ako aj morfologickej rozdiely v kvalite folikulov sú porovnateľné s dostupnými údajmi z literatúry (K o l e n a a. i., 1976; I r e l a n d a R o c h e, 1982; 1983; D i e l e m a n a i., 1983; L a z á r a i., 1990, 1991).

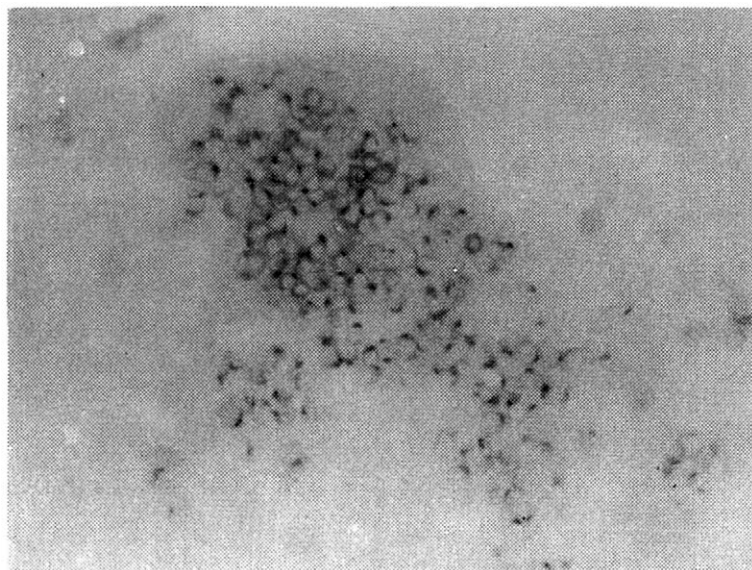
Zmeny koncentrácií steroidov vo folikulárnej tekutine sú markerami, ktoré odrážajú schopnosť folikulu produkovať a vylučovať steroidy (E n g l a n d a i., 1981; L a z á r a i., 1990). Pri strate schopnosti folikulu syntetizovať estradiol, vo folikulárnej tekutine sa zisťujú vyššie koncentrácie progesterónu a androgénov, čo je doprevádzané zmenou kvality folikulu, pričom histologický nález sa zhoduje s nálezmi aké sú pozorované pri atretických, resp. luteinizovaných folikuloch po LH vrchole (I r e l a n d a R o c h e, 1983; C a l l e s e n a i., 1986; F o r t i n e a i., 1991). Histologické nálezy pri estrogén dominantných folikuloch sa naopak zhodujú s nálezmi aké sú zisťované pri rastúcich vyvíjajúcich sa folikuloch (M c N a t t y a i., 1979; C a r s o n a i., 1981; W e b b a E n g l a n d, 1982). Folikuly s prevládajúcimi koncentraciami progesterónu (progesterón dominantné) sa veľkosťou nelíšia od estrogén dominantných folikulov (Z i m m e r m a n n a i., 1990), obsahujú menej buniek granulózy a majú narušenú bazálnu membránu



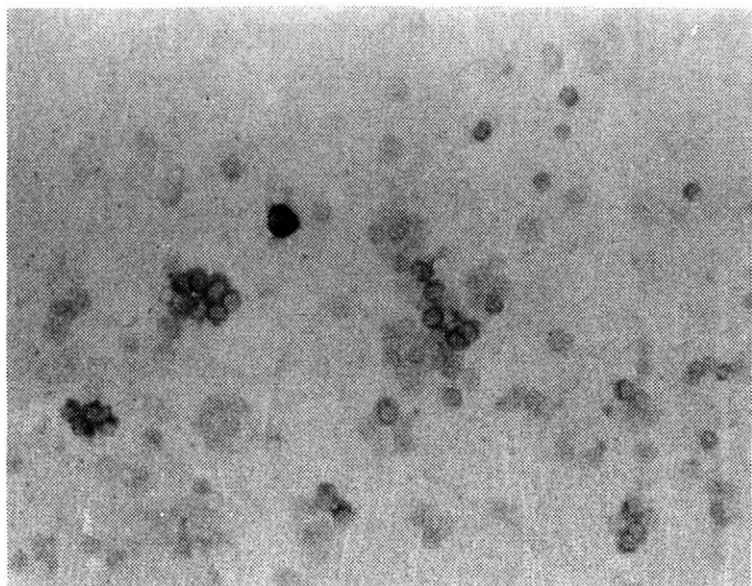
1. Aktivita kyslej fosfatázy. Progesterón dominantný folikul. Koncentrácie E₂ 194,0 nmol/l; P₄ 5729,4 nmol/l; zväčšenie 290x - The activity of acid phosphatase. A progesterone dominant follicle. The concentration of E₂ 194.0 nmol/l; P₄ 5729.4 nmol/l; 290-fold magnification



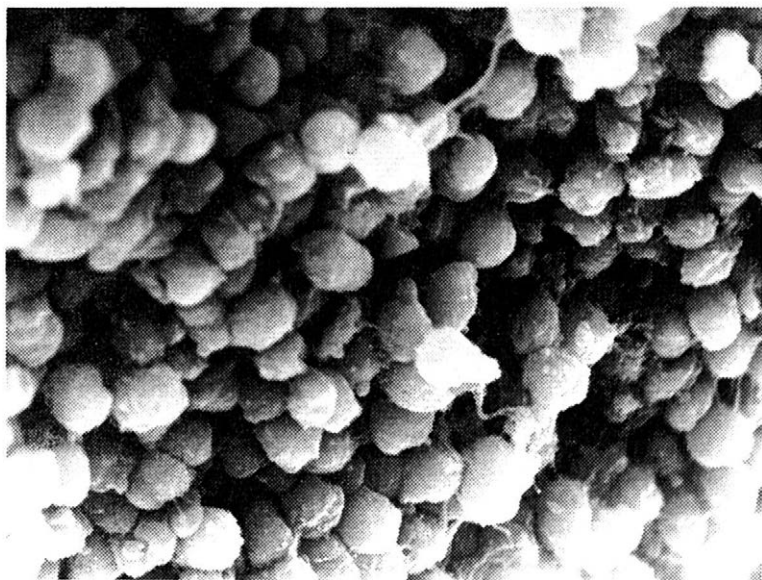
2. Aktivita nešpecifickej esterázy. Progesterón dominantný folikul. E₂ 194,0 nmol/l; P₄ 5729,4 nmol/l; zväčšenie 290x - The activity of nonspecific esterase. A progesterone dominant follicle. E₂ 194.0 nmol/l; P₄ 5729.4 nmol/l; 290-fold magnification



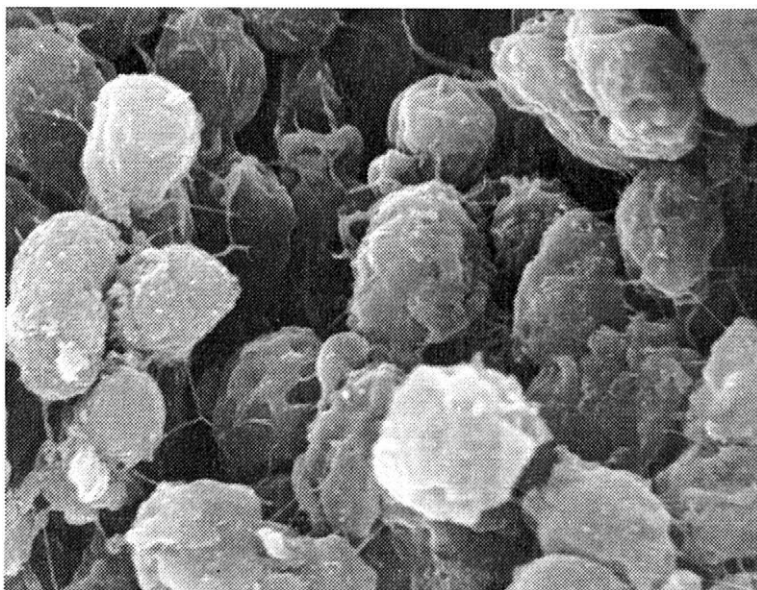
3. Aktivita kyslej fosfatázy. Progesterón dominantný folikul pri nízkych koncentráciách. E₂ a P₄ 83,9 nmol/l, resp. 235,2 nmol/l; zväčšenie 290x - The activity of acid phosphatase. A progesterone dominant follicle at low concentrations. E₂ and P₄ 83.9 and 235.2 nmol/l, respectively; 290-fold magnification



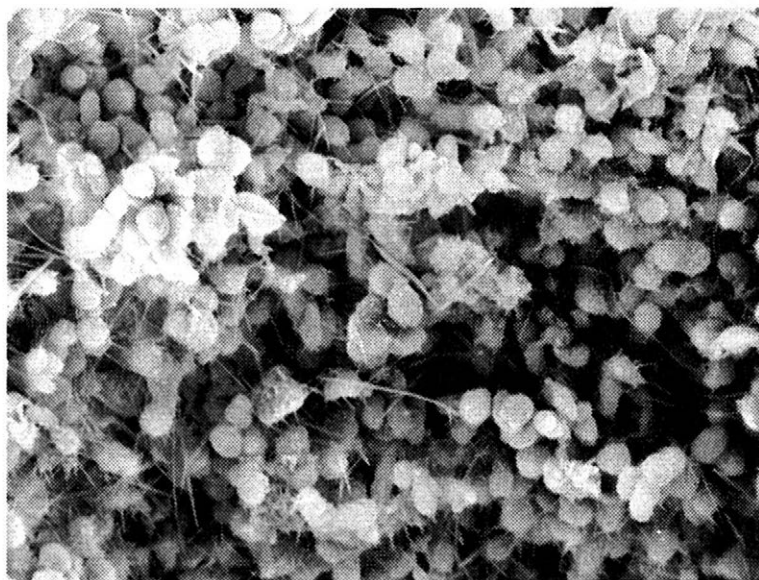
4. Aktivita nešpecifickej esterázy. Estrogén dominantný folikul. E₂ 440,0 nmol/l; P₄ 112,2 nmol/l; zväčšenie 290x - The activity of nonspecific esterase. An oestrogen dominant follicle. E₂ 440.0 nmol/l; P₄ 112.2 nmol/l; 290-fold magnification



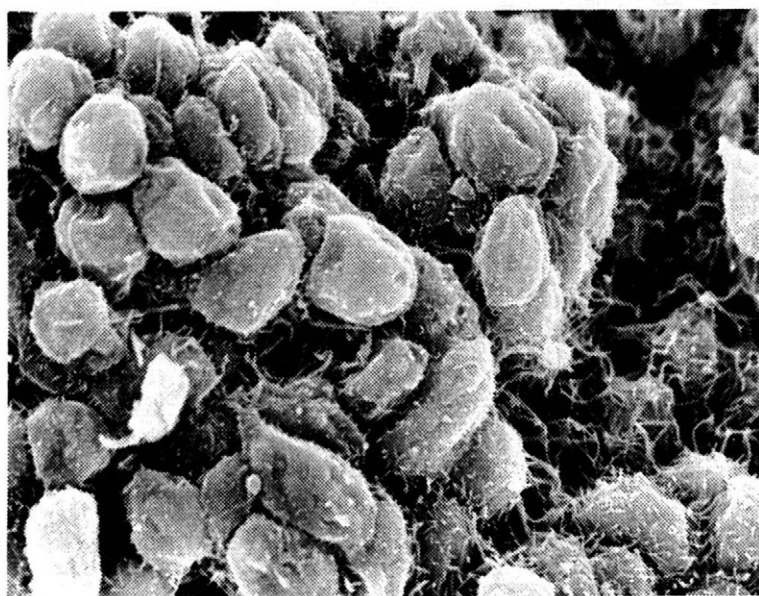
5. Rastrovacia elektrónová mikroskopia. Estrogén dominantný folikul. E₂ 440,0 nmol/l; P₄ 112,2 nmol/l; zväčšenie 3,0 x 1500 - Scanning electron microscopy. An oestrogen dominant follicle. E₂ 440.0 nmol/l; P₄ 112.2 nmol/l; 3.0 times 1,500 magnification



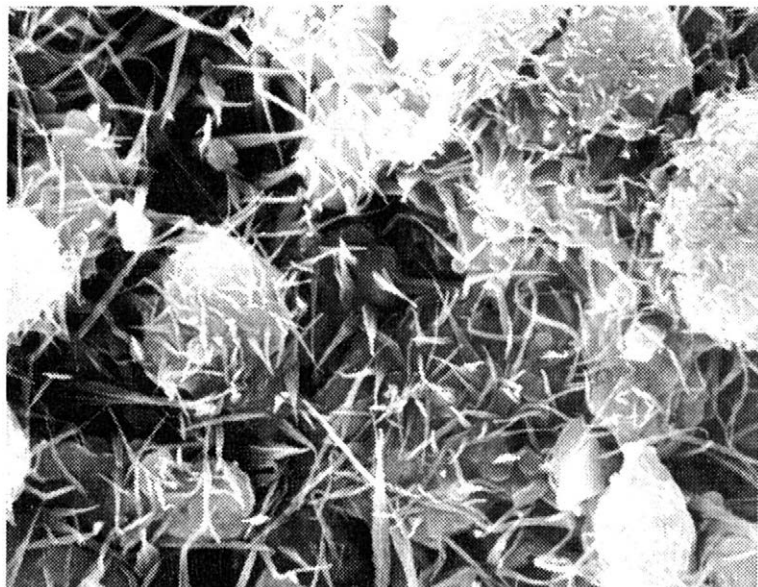
6. Estrogén dominantný folikul. E₂ 10180,0 nmol/l; P₄ 473,7 nmol/l; zväčšenie 2,8 x 2500 - An oestrogen dominant follicle. E₂ 10180.0 nmol/l; P₄ 473.7 nmol/l; 2.8 times 2,500 magnification



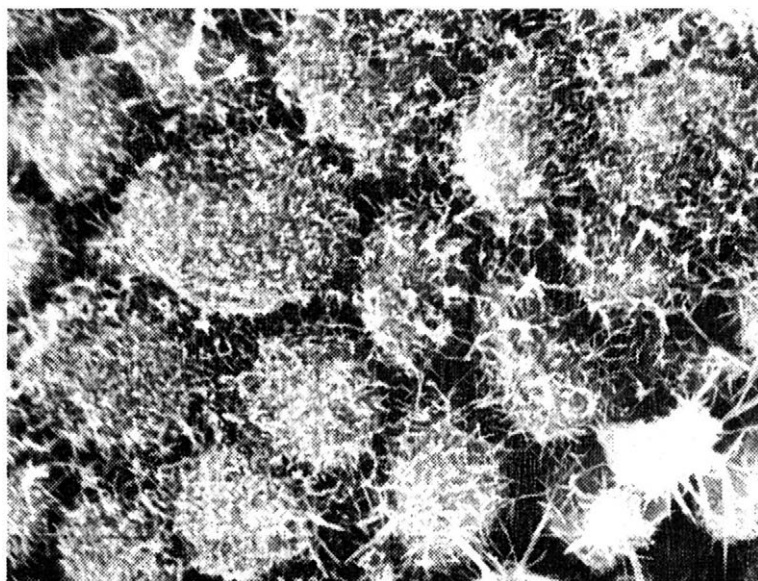
7. Estrogén dominantný folikul s nízkou aktivitou steroidov. E₂ 170 nmol/l; P₄ 18,9 nmol/l; zváženie 3,0 x 600 - An oestrogen dominant follicle with the low activity of steroids. E₂ 170 nmol/l; P₄ 18.9 nmol/l; 3.0 times 600 magnification



8. Progesterón dominantný folikul nízke koncentrácie steroidov. E₂ 83,9 nmol/l; P₄ 225,2 nmol/l; zváženie 2,8 x 2000 - A progesterone dominant follicle. Low concentrations of steroids. E₂ 83.9 nmol/l; P₄ 225.2 nmol/l; 2.8 times, 2,000 magnification



9. Progesterón dominantný folikul. E_2 194,0 nmol/l; P_4 5729,4 nmol/l; zväčšenie 2,8 x 2500 - A progesterone dominant follicle. E_2 194.0 nmol/l; P_4 5729.4 nmol/l; 2.8 times 2,500 magnification



10. Progesterón dominantný folikul. E_2 18,9 nmol/l; P_4 2567,1 nmol/l; zväčšenie 2,8 x 2500 - A progesterone dominant follicle. E_2 18.9 nmol/l; P_4 2567.1 nmol/l; 2.8 times 2,500 magnification

a vrstvy téky a tiež zníženú schopnosť viazať gonadotropíny (Ireland a Roche, 1983).

V takýchto folikuloch sa pri histologických vyšetreniach zisťuje zvýšený výskyt buniek granulózy s pyknotickými jadrami (Ryan, 1981).

Pri nastupujúcej atrézii, resp. pri zmene kvality folikulov dochádza okrem zmien morfológických a endokrinných aj k histochemickej zmene kvality buniek membrána granulóza. Tieto histochemické zmeny, predchádzajú následným morfológickým zmenám atrézie folikulov (Ryan, 1981).

Sú známe rozdiely v enzymatickej aktivite alkalickéj fosfatázy, leucín aminopeptidázy, laktát dehydrogenázy v predovulačných folikuloch. Tiež sa zistil zvýšený výskyt aktivity kyslej fosfatázy a nešpecifickej esterázy v bunkách granulózy Graafových folikulov potkanov po aplikácii PMSG - hCG (Guraya, 1985). Zvýšenie koncentrácie enzýmov sa zistilo bez toho, že by boli pozorované morfológické zmeny pri použití klasických histologických techník na bunkách bez najmenších príznakov luteinizácie, resp. degenerácie (Guraya, 1985).

Pri posudzovaní folikulov na základe rastrovacej elektrónovej mikroskopie sme dospeli k názoru, že histochemické zmeny a endokrinné zmeny folikulov sú v úzkom vzťahu s morfológickými zmenami buniek granulózy, aj keď tieto klasickými histologickými technikami na úrovni svetelnej mikroskopie ešte nie sú zistiteľné. Obraz kvality folikulárných buniek nami sledovaných estrogén dominantných folikulov zodpovedá kvalite zdravých rastúcich folikulov, ako to opísali vo svojej práci Chang a i. (1978).

Bunky granulózy pravidelného tvaru bez mikroklkov zodpovedali bunkám z folikulov estrogén dominantných, pričom zvyšovanie sa koncentrácií progesterónu má za následok objavenie sa buniek menších, pravdepodobne pyknotických (Chang a i., 1978) a neskôr mikroklkov. Pri výraznejšej luteinizácii vo folikuloch s prevládajúcimi koncentraciami progesterónu sú tieto bunky zastreté veľkým počtom mikroklkov. Podobný obraz opísali aj Chang a Ryan (1976) vo veľkých folikuloch ošetrovaných potkanov po 24 - 36 hodinách od podania PMSG pri nastupujúcej luteinizácii.

Tento poznatok autorov pri porovnaní s našimi výsledkami nás podporuje v názore, že objavenie sa mikroklkov na bunkách granulózy je znakom luteinizácie buniek v dôsledku zvýšených koncentrácií progesterónu a predchádzajú vlastnej luteinizácii, resp. atrézií buniek granulózy.

Záverom, môžeme konštatovať, že morfológické zmeny buniek granulózy sú predchádzané tak histochemickými zmenami niektorých enzýmov buniek granulózy, ako aj zmenami produkcie steroidov folikulárnymi bunkami.

Literatúra

- CALLESEN, H. - GREEVE, T. - HYTTTEL, P.: Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, 25, 1986, s. 71-86.
- CARSON, R. S. - FINDLAY, J. K. - CLARKE, I. J. - BURGER, H. G.: Estradiol testosterone and androstendione in bovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol. Reprod.*, 24, 1981, s. 105-113.

- DIELEMAN, S. J. - KRUIP, T. H. A. M. - FONTIJNE, P. - de JONG, W. H. R. - Van der WEYDEN, G. C.: Changes in estradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J. Endocrinol.*, 97, 1983, s. 31-42.
- DRIANCOURT, M. A.: Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, 35, 1991, s. 55-79.
- ENGLAND, B. G. - WEEB, R. - FAHVER, M. K.: Follicular steroidogenesis and gonadotrophin binding to bovine follicles during the estrous cycle. *Endocrinology*, 109, 1981, s. 881-885.
- ERICKSON, G. F.: An analysis of follicle development and ovum maturation. *Semin. Reprod. Endocrin.*, 4, 1986, s. 233-254.
- FORTUNE, J. E. - SIROIS, J. - TURZILLO, A. M. - LAVOIR, M.: Follicle selection domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil.*, 43, 1991, s. 189-198.
- GURAYA, S. S.: Biology of ovarian follicles in mammals. Springer Verlag 1985.
- HISAW, F. L.: Development of the Graafian follicle and ovulation. *Physiol. Rev.*, 27, 1947, s. 95-110. In: ERICKSON, G. F.: An analysis of follicle development and ovum maturation. *Semin. Reprod. Endocrin.*, 4, 1986, s. 233-254.
- HSUEH, A. J. W.: Paracrine mechanism involved in granulosa cell differentiation. *J. clin. Endocrin. Metab.*, 15, 1986, s. 117-125.
- HSUEH, A. J. W. - ADASHI, E. Y. - JONES, P. B. C. - WELSH, T. H.: Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrin. Rev.*, 5, 1984, s. 76-85.
- CHANG, S. C. S. - RYAN, R. J.: Time study of effects of pregnant mares serum gonadotrophin on surface characteristics of granulosa cells in rat ovaries. *Mayo clin. Res.*, 51, 1976, s. 621-623.
- CHANG, S. C. S. - RYAN, R. J. - KANG, Y. H. - ANDERSON, W. A.: Some observations on the development and function of ovarian follicles. In: SREENAN, J. F.: Control of reproduction in the cow. Hague, Martinus Nijhoff 1978.
- IRELAND, J. J. - ROCHE, J. F.: Development and regression of individual ovulatory and non-ovulatory follicles cattle following prostaglandin induced luteolysis: Changes in steroids in follicular fluid and gonadotrophin receptor. *Endocrinology*, 111, 1982, s. 2077-2083.
- IRELAND, J. J. - ROCHE, J. F.: Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: Changes in concentrations of hormone in follicular fluid and specific binding of gonadotrophin to follicles. *J. anim. Sci.*, 57, 1983, s. 157-165.
- KOLENA, J. - CHANNING, C. P.: Stimulatory effects of LH, FSH and prostaglandin upon cyclic 3,5 - AMP levels in porcine granulosa cells. *Theriogenology*, 90, 1972, s. 1543-1550.
- LAZÁR, L. - ELEČKO, J. - MARAČEK, I.: Vplyv steroidnej dominancie na koncentrácie cAMP, cGMP, progesterónu a 17 beta-estradiolu v tekutine najväčšieho folikulu. *Veter. Med. (Praha)*, 35, 1990, s. 641-645.
- LAZÁR, L. - HAJURKA, J.: Estradiol, progesterón a cyklické nukleotidy v tekutine perzistujúcich folikulov a folikulov z luteálnej fázy pohlavného cyklu kráv. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991, s. 649-655.
- LINDNER, H. R. - AMSTERDAM, A. - SALOMON, Y. - TSAFRIRI, A. - NIMROD, A. - LAMPRECHT, S. A. - ZOR, U. - KOCH, Y.: Intraovarian factors in ovulation: determinants of follicular response to gonadotropins. *J. Reprod. Fertil.*, 51, 1976, s. 215-226.
- LOJDA, Z. - GOSSRAU, R. - SCHRIEBLER, T. H.: Enzyme histochemistry. Berlin, Springer Verlag 1979.
- Mc NATTY, K. R. - SMITH, D. M. - OSATHANONDI, R. - RYAN, J.: The human antral follicle: Functional correlates of growth and atresia. *Ann. Biol. anim. Biophys.*, 19, 1979, s. 1547-1558.
- MC NEILLY, A. S. - GLASIER, A. - JONASSEN, J. - HOWIE, P. W.: Evidence for direct inhibition of ovarian function by prolactin. *J. Reprod. Fertil.*, 54, 1982, s. 559-569.
- RICHARDS, J. S. - ROLFES, A. I.: Hormonal regulation of cycle AMP binding to specific proteins in rat ovarian follicles. *J. Biol. Chem.*, 255, 1980, s. 5481-5489.

RYAN, R. J.: Follicular atresia: Some speculations of biochemical markers and mechanism. In: SHWARTZ, N. B. - HUNZICKERDUNN, M.: Dynamics of ovarian function. New York, Raven Press 1981.

SCHOOMAKER, J. N. - ERICKSON, G. F.: Glucocorticoid modulation of follicle-stimulating hormone-mediated granulosa cells differentiation. *Endocrinology*, 113, 1983, s. 1356-1363.

SCHREIBER, J. R. - NAKAMURA, K. - ERICKSON, G. F.: Progesterone inhibition of estrogen production by cultured rat granulosa cells. *Molec. cell Endocrin.*, 20, 1980, s. 165-173.

WEBB, R. - ENGLAND, B. G.: Identification of the ovulatory follicles in theca: Associated changes in follicular size, theca and granulosa cell luteinizing hormone receptors, antral fluid steroids and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocrinology*, 110, 1981, s. 873-881.

ZIMMERMANN, R. C. - WESTHOF, G. - THATCHER, S. - PEUKERT-ADAM, I. - GRUNERT, E. - BRAENDLE, W.: Follicular size and steroid secretion of dominant bovine follicles. *Zbl. Gynäk.*, 112, 1990, s. 1279-1283.

Došlo 9. 12. 1992

LAZÁR, L. - KOŁODZIEYSKI, L. (Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice; University of Veterinary Medicine, Košice):

The effect of steroid dominant follicles upon enzymatic activity and the morphological shape of granulosa cells.

Veter. Med., - Czech, 38, 1993 (6) : 321-332.

The cyclic nature of the female reproduction process depends to a considerable degree on the unique capacity of ovarian follicles to change their structure and function. The differentiation process during folliculogenesis takes place in all parts of the follicle. Granulosa cells reflect a high degree of structural changes and play an important role in functional maturation of the inert follicle. Changes in the reaction to endocrine and paracrine effects from a unique environment that is inevitably necessary for oocyte growth and ovulation were reached by changes in the biochemical activity and the internal anatomic mutual relation of the follicle (Linder et al., 1976; Hsueh, 1976). This growth process and differentiation depends on gonadotropic stimulation of the follicles and the quantity of receptor sites able to bind them.

The aim of this work was compare estradiol 17-beta and progesterone levels in the follicular fluid of the largest follicles with the morphological structure and enzymatic activity of membrana granulosa cells.

Ovaries were obtained from 34 SS x LBS randomly chosen cows at the slaughterhouse. Follicular fluid to estradiol 17-beta and progesterone level determination was obtained by aspiration of the largest follicles. Estradiol 17-beta and progesterone levels were determined by RIA sets from the ÚRVJT (Institute of Radioecology and Use of Nuclear Techniques) in Košice, type RIA-test-ESTRA (SI-125-129) and RIAA-test-Prog (SI-125-6), respectively. With the methods used the variation coefficient of intra- and interassay for the estradiol 17-beta of the RIA set were 10.1 and 13.3 %, for progesterone of the RIA set these values were 11.4 and 13.7 % respectively.

Steroid dominance of follicles was determined by the method described by Cullen et al. (1986), based on the expression of the index of the mutual relation between progesterone levels and estradiol 17-beta was levels. Excisions from the follicular wall were examined under the scanning electron microscope JEOC 1200 Mx at an acceleration

voltage of 20 kV. In granulosa cell smears acid phosphatase and non-specific esterase activity were determined by incubation in the incubation media according to L o j d a et al. (1979). Steroid levels are given in nmol/l $\pm$ SEM.

Mean estradiol 17-beta levels in estrogen dominant follicles were proved to be 2170.0 ± 1605.3 nmol/l, whereby individual concentrations ranged from 170.0 nmol/l to 10180.0 nmol/l.

Mean progesterone concentrations in these follicles were 260.1 ± 69.1 nmol/l with, individual levels ranging from 98.9 to 473.7 nmol/l.

Mean estradiol 17-beta levels in progesterone dominant follicles were 225.8 ± 130.7 nmol/l, at individual ranges from 1.7 to 1118.0 nmol/l. Mean progesterone levels in the same follicles were 2121.7 ± 675.5 nmol/l, at individual levels ranging from 225.2 to 5729.4 nmol/l.

The enzymatic activity of both acid phosphatase and non-specific esterase was marked mainly in the granulosa cells coming from progesterone dominant follicles. The staining intensity was found to range from + to +++ crosses (Figs. 1 and 2). In estrogen dominant follicles and at low progesterone concentration follicles the low activity of one (+) cross was stated for both enzymes under examination (Fig. 3 and 4). The intensity of the observed enzyme activity was related to the progesterone level.

In the presence of follicular estrogen dominance the marked uniform size of membrana granulosa cells was shown by a scanning electron microscope (Figs. 5 and 6). With the increase of progesterone levels in the follicular fluid the occurrence of a larger amount of smaller light pycnotic cells could be seen (Figs. 7 and 8). Marked luteinizing follicles were observed together with a great number of microvilli on the granulosa cells (Figs. 9 and 10).

The results indicate a close relation between the changes of steroid concentrations in the follicular fluid and the changes of follicular cell enzymatic activity and the morphological shape of the follicular wall.

cow; follicle; progesterone; estradiol 17-beta; acid phosphatase; non-specific esterase; scanning electron microscopy

Contact Address:

MVDr. Ladislav L a z á r , CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice
Tel. 095 37429, fax 095 31853

ELEKTRONOVĚ MIKROSKOPICKÝ PRŮKAZ VIRU EPIDEMICKÉ DIARRHOEY PRASAT V ČESKÉ REPUBLICE

B. Šmíd, L. Valíček, L. Rodák, J. Kudrna, J. Musilová

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

Ve dvou chovech prasat byla zjištěna epidemická diarrhoea prasat (PED) způsobená koronaviry, které byly elektronově mikroskopicky prokázány ve střevním obsahu. Experimentální přenos infekce filtrátem střevního obsahu na hysterektomovaná bezkolostránní selata byl úspěšný. Virus byl prokázán elektronově mikroskopicky ve střevním obsahu průjemujících selat od 12 h do 4 dnů po infekci a v epiteliálních buňkách sliznice tenkého střeva za 18 h po infekci. Rastrovací elektronovou mikroskopií bylo zjištěno zkracování a fúze klků sliznice tenkých střev. Identifikace izolovaného viru byla provedena imunoelektronovou mikroskopií s využitím specifického séra proti referenčnímu kmeni PED-CV 777.

coronavirus prasat; elektronová mikroskopie; negativní barvení; imunoelektronová mikroskopie; ultratenké řezy

Epidemická diarrhoea prasat, označovaná anglickou zkratkou PED (Porcine Epidemic Diarrhoea), byla poprvé popsána v Anglii v roce 1977 jako epidemická diarrhoea prasat typu II (W o d , 1977), která postihovala pouze selata a u níž původce onemocnění nebyl prokázán. V roce 1978 pak publikovali jak v Anglii (C h a s e y a C a r t w r i g h t , 1978), tak i v Belgii (P e n s a e r t a D e b o u c k , 1978) téměř současně práce o koronavirovém původci epidemické diarrhoey prasat, který se liší antigenně od ostatních koronavirů. Protože se virus nedařilo kultivovat na buněčných kulturách, byla k jeho pomnožení používána bezkolostránní hysterektomovaná selata. P e n s a e r t a D e b o u c k (1978) izolovali na bezkolostránních selatech kmen označený CV 777, který se dnes běžně používá jako referenční kmen. Uvedení autoři popsali dále experimentální infekci hysterektomovaných bezkolostránních selat od 3. do 15. dne věku. U všech infikovaných selat se objevil vodnatý průjem kolem 24 - 36 h po infekci. Elektronově mikroskopickým vyšetřením prokázali v obsahu střev koronavirové částice pleomorfního charakteru, velikosti 95 - 190 nm. Výběžky korony měřily 18 nm. Morfologicky se částice nelišily od ostatních koronavirů způsobujících onemocnění prasat, tj. virové gastroenteritidy prasat (TGE) a hemaglutinujícího encefalomyelitického viru prasat (HEV). Teprve v roce 1988 byla popsána první úspěšná izolace viru PED na buněčných kulturách (H o f m a n n a W y l e r , 1988).

Virus PED, kmen CV 777, byl od počátku studován z různých hledisek. Experimentální infekci byla věnována práce autorů D e b o u c k a P e n s a e r t (1980) a D e b o u c k aj. (1981), morfogenezi viru v epiteliálních buňkách střev práce autorů D u c a t e l l e aj. (1981, 1982), patologickým změnám u experimentálně

infikovaných selat práce autorů C o u s s e m e n t aj. (1982) a změnám na sliznicích střev po experimentální infekci pomocí rastrovací elektronové mikroskopie práce autorů D u c a t e l l e aj. (1981). Z hlediska diagnostiky PED byly publikovány práce věnující pozornost elektronově mikroskopické a imunofluorescenční diagnostice (P e n s a e r t aj., 1981; D e b o u c k aj., 1981; P r a g e r a W i t t e , 1981) a enzymoimunoanalytické metodě (C a l l e b a u t aj., 1982).

Cílem naší práce bylo využít elektronově mikroskopických metod k průkazu viru PED v našich chovech a k hlubšímu studiu onemocnění, které umožní vypracování a zavedení dalších diagnostických metod.

MATERIÁL A METODY

PŘIROZENÁ INFEKCE

Vzorky obsahu střev z utracených selat byly získány během hromadného výskytu průjmových onemocnění prasat v roce 1987 na farmě Mackovice (okres Znojmo) a farmě Střítež (okres Třebíč). Na farmě Mackovice se onemocnění projevilo u všech kategorií prasat vysokým úhynem selat. Na farmě Střítež byli postiženi výkrmoví běhouni a průjmové onemocnění bylo dáváno do souvislosti s předchozím přísunem prasat.

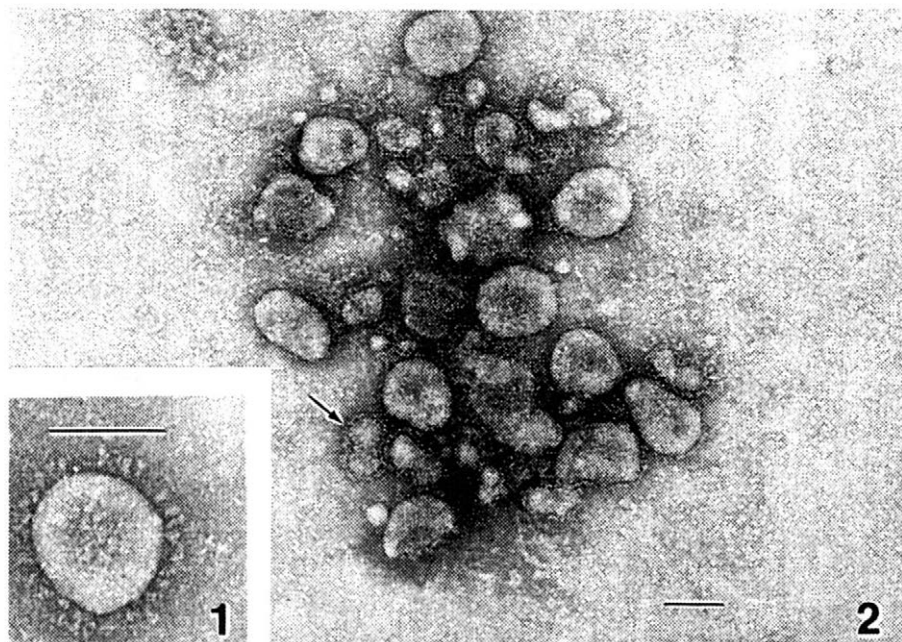
ELEKTRONOVĚ MIKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ OBSAHU STŘEV

K přímému průkazu viru PED ve výkalech prasat byla použita metoda negativního barvení 2% vodným roztokem molybdenanu amonného při pH 7,0. K vlastnímu barvení byl použit supernatant získaný centrifugací 20% suspenze výkalů v Earlově médiu bez séra (použita centrifuga Janetzki K24, 3000 x g při teplotě 4 °C po dobu 30 min).

EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE

K infekci bezkolostrálních hysterektomovaných selat byl použit filtrát supernatantu z 20% suspenze obsahu střev nemocných prasat (farma Mackovice) v Earlově médiu s antibiotiky (100 m.j. penicilinu a 200 μ streptomycinu na 1 ml) bez séra. Suspenze byla odstředěna při 3000 x g při teplotě 4 °C po dobu 30 min a supernatant filtrován přes membránový filtr s póry 450 nm. Čtyřdenní selata byla perorálně infikována po 2 ml z filtrátu a za 48 h po infekci utracena. Z obsahu střev utracených selat byla připravena 20% suspenze v Earlově médiu a zpracována stejným způsobem jako pro experimentální infekci. Získaná filtrovaná virová suspenze byla naplněna do ampulí a uložena při -70 °C jako zásobní suspenze viru. Virus byl prokázán v suspenzi metodou imunoelektronové mikroskopie s využitím maďarského hyperimunního séra prasat proti referenčnímu kmeni CV 777.

Virus PED, kmen CV 777, byl získán v lyofilizovaném stavu od prof. Pensaerta z Belgie a byl pomnožen na dvou hysterektomovaných selatech infikovaných perorálně po 1 ml virové suspenze. Za 48 h po infekci byla získána a zpracována suspenze z obsahu střev jako u vlastního kmene „Mackovice“.



1. Virion epidemické diarrhoey prasat (PED). Negativní barvení; úsečka značí 100 nm – A virion of porcine epidemic diarrhoea (PED). Negative staining; the bar is 100 nm

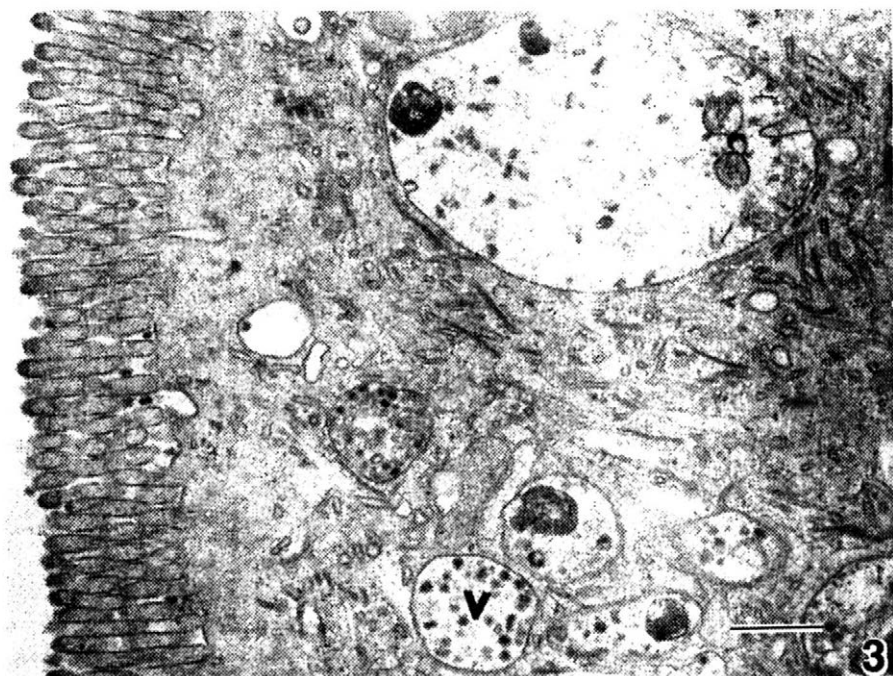
2. Imunokomplex viru PED. Šipka ukazuje zřetelnou korónu virionů; negativní barvení; úsečka značí 100 nm – PED virus immunocomplex. Arrow points to the clearly visible corona of virions; negative staining; the bar is 100 nm

PŘÍPRAVA HYPERIMUNNÍHO SÉRA

K imunizaci byla použita šestidenní hysterektomovaná bezkolostrální selata, kterým bylo perorálně aplikováno po 2 ml zásobní suspenze viru kmene „Mackovice“. Stejným způsobem byla provedena za 4 týdny perorální reinfekce. Za dalších 14 dní bylo selatům aplikováno intraperitoneálně po 3 ml zásobní suspenze viru a za 5 dní poté byla selata vykřvena. Specifita získaného séra byla ověřena metodou imunoelektronové mikroskopie.

METODA IMUNOELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE (IEM)

K identifikaci prokázaného koronaviru kmene „Mackovice“, „Střítež“ a CV 77 byl použit supernatant střevního obsahu připravený pro negativní barvení, který byl smísen s prasečím hyperimunním sérem proti viru PED v geometrickém ředění 1 : 2 až 1 : 128. Do zkumavek Eppendorf byl k supernatantu virové suspenze přidán stejný objem příslušného ředění séra. Po promíslení byly vzorky inkubovány 1 h při teplotě 37 °C a poté byly vyšetřovány metodou negativního barvení. Nespecifická reakce séra byla vyloučena s virem transmisivní gastroenteritidy prasat (TGE), kmenem M42, a rotavirem prasat, kmenem OSU.



3. Ultratenký řez části enterocytů tenkého střeva selete za 18 h po infekci virem PED: Virové částice jsou patrné ve vakuolách (V) i na povrchu mezi mikrokly; úsečka značí 1000 nm – Ultrathin section of a part of small intestine enterocytes of a piglet of 18 hours after PED virus infection. Virus particles are visible in vacuoles (V) and also on the surface between the villi; the bar is 1,000 nm

METODA ULTRATENKÝCH ŘEZŮ

K průkazu viru u bezkolostránních selat experimentálně infikovaných kmenem „Mackovice“ byly použity vzorky tenkého střeva (ileu) odebrané za 18 h po infekci, fixované v 3% pufovaném roztoku glutaraldehydu při pH 7,2. Kousky fixované tkáně o velikosti asi 1 mm³ byly postfixovány 1 h v 1% pufovaném roztoku OsO₄ při pH 7,2. Pak následovalo odvodňování ve vzestupné acetonové řadě s následným prosycováním a zalitím do směsi Durcupan ACM. Polymerace probíhala při teplotě 60 °C po dobu 48 hodin. Ultratenké řezy byly zhotovovány na ultramikrotomu LKB III, kontrastovány uranylacetátem a citrátem olova. K prohlížení a dokumentaci byl použit elektronový mikroskop Tesla BS 500.

RASTROVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

K zjišťování změn na povrchu střevních sliznic experimentálně infikovaných selat byly odebírány vzorky střev za 12, 24, 36, 48 a 96 h po infekci do 3% roztoku glutaraldehydu. Odebrané vzorky byly odvodněny v acetonové řadě, vysušeny v kritickém bodu a pokoveny zlatem. Prohlížení a dokumentace byly prováděny na elektronovém mikroskopu Tesla BS 300.



4. Ultratenký řez částí enterocytů tenkého střeva selate za 18 h po infekci virem PED. Šipka označuje destruovaný mikrovilk, hvězdička označuje virovou částici mezi mikrovilk; úsečka značí 500 nm – Ultrathin section of a part of small intestine enterocytes of a piglet of 18 hours after PED virus infection. Arrow points to a destroyed microvillus, asterisk to a virus particle between two microvilli; the bar is 500 nm

VÝSLEDKY

PRŮKAZ VIRU PED VE STŘEVNÍM OBSAHU PRŮJMUJÍCÍCH PRASAT

Metodou negativního barvení byl coronavirus prokázán v suspenzi střevního obsahu prasat z lokality Mackovice i z lokality Střítež. Coronavirové částice byly pleomorfní a dosahovaly velikosti 130 - 180 nm s typickými výběžky tvořícími korónu o průměrné velikosti 18 nm (obr. 1). V některých vzorcích byly coronavirové částice bez výběžků nebo značně destruované.

Při IEM byla optimální tvorba imunokomplexů dosahována při ředění séra 1 : 4. Toto ředění bylo dále používáno k průkazu viru PED u experimentálně infikovaných selat. Imunokomplexy byly charakteristické shlukem pleomorfních coronavirových částic, jejichž struktura koróny byla často zastřena navázanými a obarvenými protilátkami (obr. 2), ale byla patrná na některých částicích (obr. 2, šipka).

PRŮKAZ VIRU PED PO EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCI

Při experimentální infekci hysterektomovaných bezkolostrálních selat virem PED, kmenem „Mackovice“, byly metodou negativního barvení a imunoelektronové



5. Povrchové změny na sliznici ilea za 24 h po infekci virem PED. F značí fúzi dvou mikroklků; rastrovací elektronová mikroskopie; zvětšení 200x – Superficial lesions in the ileal mucosa 24 hours after PED virus infection. F denotes the fusion of two microvilli; scanning electron microscopy; 200-fold enlargement

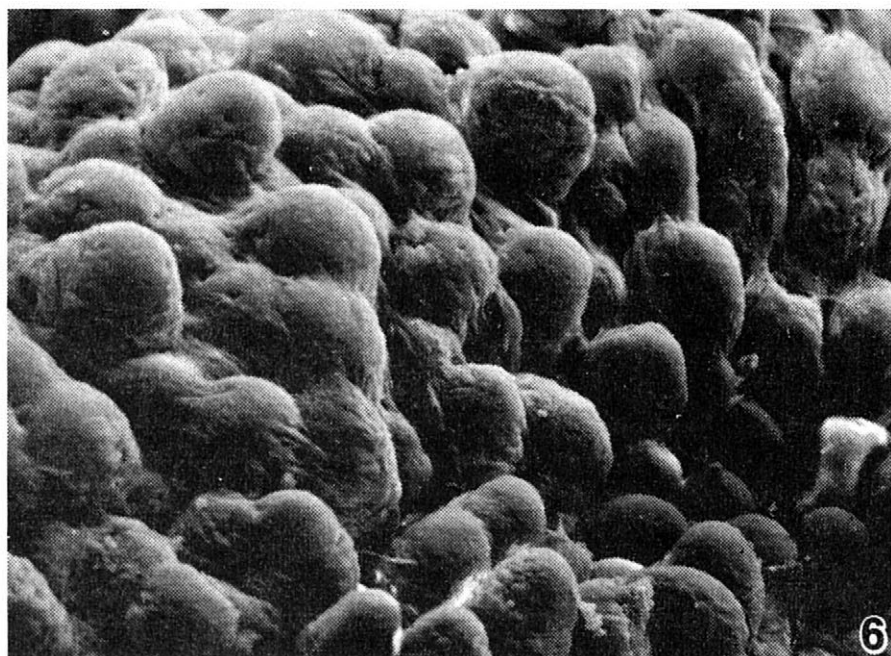
mikroskopie prokazovány v obsahu střev koronaviry od 12 h do 4 dnů po infekci s maximem viru za 48 h po infekci. Od 5. dne po infekci byly zjišťovány jen virové lyzáty, v nichž nebylo možno jednoznačně určit strukturu viru.

V ultratenkých řezech sliznicí jejuna bezkolostrálního selete za 18 h po infekci virem PED, kmenem „Mackovice“, bylo prokázáno velké množství virionů v cytoplazmatických vakuolách i kanálcích enterocytů (obr. 3 V). Viriony se nacházely i mezi mikroklky na povrchu enterocytů (obr. 4, hvězdička). U některých mikroklků byla patrná i jejich destrukce (obr. 4, šipka).

Rastrovací elektronovou mikroskopií povrchů sliznice ilea hysterektomovaných bezkolostrálních selat experimentálně infikovaných kmenem „Mackovice“ byly zjišťovány první změny za 24 h po infekci. Projevovaly se fúzí klků (obr. 5) a v pozdějším stadiu, za 4 dny po infekci, jejich výrazným zkrácením (obr. 6).

DISKUSE

Při výskytu hromadného průjmu ve dvou chovech prasat byl prokázán jako původce onemocnění coronavirus morfologicky i antigeně shodný s referenčním CV 777 kmenem viru epidemické diarrhoey prasat (PED). K identifikaci koronaviru



6. Povrchové změny na sliznici tenkého střeva (ilea) za 4 dny po infekci virem PED, projevující se výrazným zkrácením mikrovilků; rastrovací elektronová mikroskopie; zvětšení 200 x – Superficial lesions in the small intestine (ileal) mucosa four days after PED virus infection showing marked shortening of microvilli; scanning electron microscopy; 200-fold enlargement

PED jsme využili imunoelektronově mikroskopický průkaz virových imunokomplexů při použití specifického antiséra stejně jako P e n s a e r t aj. (1981). Tito autoři navíc srovnáním s dalšími koronaviry prokázali jednoznačnou antigenní specifitu viru PED a jeho odlišnost od dalších koronavirů. Již předtím v roce 1978 P e n s a e r t a D e b o u c k určili antigenní odlišnost kmene CV 777 do té doby známých koronavirů prasat - virové gastroenteritidy prasat (TGE) a hemaglutinujícího encefalomyelitického viru (HEV). V souladu s uvedenými autory jsme rovněž prokázali metodou IEM antigenní odlišnost viru PED od viru TGE.

Při experimentální infekci hysterektomovaných bezkolostrálních selat jsme elektronově mikroskopicky prokazovali virus v obsahu střev od 12 h až do 4 dnů po infekci. Na rozdíl od našeho zjištění D e b o u c k a P e n s a e r t (1980) prokazovali u experimentálně infikovaných bezkolostrálních selat virus v obsahu střev od 2. do 4. dne po infekci. Od 5. dne byly zjišťovány jen lyzované částice. Naše dřívější zjištění viru by mohlo být způsobeno buď rychlejší replikací virového kmene nebo vyšší infekční dávkou. Lyzované částice zjišťované od 5. dne po infekci nelze určit jako koronaviry. Z hlediska snadné elektronově mikroskopické diagnostiky je proto zapotřebí odebrat k vyšetření vzorky co nejdříve po výskytu klinických příznaků gastroenteritidy.

Metoda ultratenkých řezů sloužila jen k průkazu viru v buňkách sliznice tenkého střeva experimentálně infikovaného selete utraceného za 18 h po infekci a nikoliv pro studium morfogeneze viru, jak ji studovali Ducatelle aj. (1981, 1982) a Pospischil aj. (1981). Prokázali jsme viriony v cytoplazmatických vakuolách i v kanálcích enterocytů a mezi mikrokilky enterocytů v souladu s nálezem uvedených autorů. Náš nález virionů za 18 h po infekci odpovídá i zjištění virionů v buňkách sliznice tenkého střeva selete za 18 - 24 h po infekci autory Ducatelle aj. (1981, 1982) a liší se od zjištění autorů Pospischil aj. (1981), kteří prokazovali stejným způsobem virus za 36 - 48 h po infekci. Pospischil aj. (1981) se domnívají, že tyto rozdíly mohou záviset na virulenci použitého kmene nebo na infekční dávce viru.

Změny na sliznici ilea pozorované rastrovací elektronovou mikroskopií se projevily za 24 h po infekci počínající destrukcí a fúzí klků až po rozsáhlou fúzi spojenou s nápadným zkrácením klků pozorovaným za 4 dny po infekci. Podobné nálezy pomocí rastrovací elektronové mikroskopie po infekci bezkolostránních selat kmenem CV 777 popsali Ducatelle aj. (1981).

Od prvního průkazu viru PED ve dvou chovech prasat byly koronaviry několikrát prokázány u průjemujících prasat v dalších chovech. Přestože se jedná o náhodná vyšetření jen omezeného počtu vzorků, předpokládáme značné rozšíření coronavirových infekcí v našich chovech. Proto také naše další práce bude zaměřena na diagnostiku coronavirových infekcí u prasat.

Poděkování

Autoři děkují za pomoc při získávání vzorků MVDr. J. Velebovi z KVS Brno, MVDr. B. Polákov z OVS Znojmo, MVDr. Z. Vedralovi z OVS Třebíč, za poskytnutí referenčního virového kmene prof. M. B. Pensaertovi ze State University of Ghent, za poskytnutí referenčního hyperimunního séra dr. E. Mocsárimu z Central Veterinary Institute Budapest a za technickou pomoc Z. Mikuláškové, J. Mrvové a M. Sobotkové.

Literatura

- CALLEBAUT, P. - DEBOUCK, P. - Pensaert, M.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the coronavirus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. *Veter. Microbiol.*, 7, 1982, s. 295-306.
- COUSSEMENT, W. - DUCATELLE, R. - DEBOUCK, P. - HOORENS, J.: Pathology of experimental CV 777 *Coronavirus enteritis* in piglets. I. Histological and histochemical study. *Veter. Pathol.*, 19, 1982, s. 46-56.
- CHASEY, D. - CARTWRIGHT, S. F.: Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Res. veter. Sci.*, 25, 1978, s. 255-256.
- DEBOUCK, P. - Pensaert, M.: Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Amer. J. veter. Res.*, 41, 1980, s. 219-223.
- DEBOUCK, P. - Pensaert, M. - COUSSEMENT, W.: The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777. *Veter. Microbiol.*, 6, 1981, s. 157-165.
- DUCATELLE, R. - COUSSEMENT, W. - Pensaert, M. B. - DEBOUCK, P. - HOORENS, J.: *In vivo* morphogenesis of a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Arch. Virol.*, 68, 1981, s. 35-44.

- DUCATELLE, R. - COUSSEMENT, W. - DEBOUCK, P. - HOORENS, J.: Pathology of experimental CV 777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study. *Veter. Pathol.*, 19, 1982, s. 57-66.
- HOFMANN, M. - WYLER, R.: Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J. clin. Microbiol.*, 26, 1988, s. 2235-2239.
- PENSAERT, M. B. - DEBOUCK, P.: A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.*, 58, 1978, s. 243-247.
- PENSAERT, M. B. - DEBOUCK, P. - REYNOLDS, D. J.: An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent, CV 777, and several coronaviruses. *Arch. Virol.*, 68, 1981, s. 45-52.
- POSPISCHIL, A. - HESS, R. G. - BACHMANN, P. A.: Light microscopy and ultrahistology of intestinal changes in pigs infected with epizootic diarrhoea virus (EDV): comparison with transmissible gastroenteritis (TGE) virus and porcine rotavirus infections. *Zbl. Veter.-Med., R. B.*, 1981, s. 564-577.
- PRAGER, D. - WITTE, K. H.: The serological diagnosis of epizootic viral diarrhoea of pigs by indirect immunofluorescence technique. 2. The antibody response following experimental infection. *Tierärztl. Umsch.*, 36, 1981, s. 477.
- WOOD, E. N.: An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Vet. Res.*, 100, 1977, s. 243-244.

Došlo 4. 3. 1993

ŠMÍD, B. - VALÍČEK, L. - RODÁK, L. - KUDRNA, J. - MUSILOVÁ, J. (Veterinary Research Institute, Brno):

Electron microscopic demonstration of porcine epidemic diarrhoea in the Czech Republic.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993, (6) : 332-341.

Coronavirus-induced porcine epidemic diarrhoea (PED) was diagnosed in two swine herds. The causal agent was demonstrated in intestinal contents by electron microscopy and identified by immunoelectron microscopy using specific immune serum to the reference strain PED-CV77. Experimental transmission to hysterectomy-derived, colostrum-deprived piglets with an intestinal contents filtrate was successful. The virus was demonstrable by electron microscopy in the intestinal contents between 12th hour and 4th day, and in small intestinal epithelial cells 18 hours after infection. Scanning electron microscopy revealed shortening and fusion of villi of small intestinal mucosa.

porcine coronavirus; electron microscopy; negative staining; immunoelectron microscopy; ultrathin sections

Contact Address:

MVDr. Bedřich Š m í d, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70,
621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 741121, fax 05 752240

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 7/1993 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny tyto příspěvky:

Hipíková V., Mojžišová J., Bajová V., Takáčová D., Stojný L.: Hodnotenie niektorých ukazovateľov bunecnej imunity po experimentálnej infekcii vírusom IBR u teliat ošetrovaných glukánom

Paulík Š., Bajová V., Benko G.: Úroveň oneskorenej precitlivosti a primárnej protilátkovej odpovede po aplikácii inaktivovanej olejovej IBR vakcíny u teliat premedikovaných glukánom

Bomba A., Králíček E., Koniarová I., Lešník F., Pošivák J., Bučko V., Žitňan R.: Získavanie a odchov gnotobiotických jahniat a ich využitie vo veterinárnej medicíne

Krajčovičová-Kudláčková M., Ozdín E.: Vplyv rastlinnej výživy na niektoré hodnoty metabolizmu bielkovín a tukov u potkanov v rôznom veku

Jandl J., Sladovník K.: Přechod radiocesia do králíčího masa a jeho exkrece

Bystrický P., Pipová M.: Vplyv kvality tukovej zložky vstupných surovín na kvalitu tukov vo výrobku

Rychlík I., Šišák F., Lány P.: Differentiation of *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* by plasmid profile analysis and restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA

VPLYV HERBICÍDU BENTAZÓN ČESKOSLOVENSKEJ PROVENIENCIE NA INVADOVANOSŤ OVIEC GASTROENTERONEMATÓDAMI

J. Neuschl, J. Čižmárová, J. Lopuchovský

Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

Na ovciach plemena slovenské merino (ustajnené na hlbkej podstielke a denne vyhánané na pastvu) sa v jesennom a jarnom období overoval možný antihelmintický účinok československého herbicídu bentazón (Výskumný ústav chemickej technológie, Bratislava) proti bežne vyskytujúcim sa strongylátom gastrointestinálneho traktu. Opodstatnenie, zamerať sa na sledovanie antihelmintického účinku predmetného herbicídu bola skutočnosť, že sme nemohli vylúčiť jeho možný zásah do energetického metabolizmu helmintov, na čo nepriamo poukazovali naše toxikologické štúdie v podmienkach akútnej a subakútnej intoxikácie. V jesennom období sa bentazón podával v dávke 250 mg/kg ž.h. a v jarnom období v dávke 500 mg/kg živej hmotnosti. Aplikoval sa jednorázovo *per os* sondou v slnečnicovom oleji. Kontrolné koprologické vyšetrenie na 10. deň po aplikácii predmetného herbicídu dokazuje v oboch pokusoch nevýrazne nižšiu invadovanosť oviec v porovnaní s nálezom pred jeho podaním. V účinnosti bentazónu v závislosti od jeho dávky sa nezaregistrovali podstatnejšie rozdiely.

ovce; čs. herbicíd bentazón; antihelmintický účinok; strongyláty gastrointestinálneho traktu

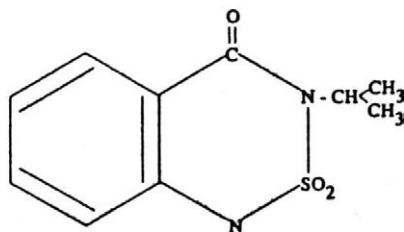
Poznať toxikologicko-hygienickú charakteristiku každého novo doporučeného herbicídu pred jeho zavedením do poľnohospodárskej praxe nastoľuje požiadavku výskumu miery ich toxikologického rizika a biologických účinkov u hlavných druhov hospodárskych a voľne žijúcich zvierat.

Z uvedeného aspektu v spolupráci s Výskumným ústavom chemickej technológie v Bratislave bola na pracovisku zrealizovaná komplexnejšia toxikologická testácia herbicídu bentazón československej proveniencie. Toxikologické štúdie sa realizovali na ovciach, králikoch a bažantoch v podmienkach akútnej a subakútnej intoxikácie (K a č m á r a i., 1988a, N e u s c h l a K a č m á r, 1992a, N e u s c h l a K a č m á r, 1993) a na ovciach v podmienkach subchronickej intoxikácie - 3-mesačný skrmovací experiment (K a č m á r a i., 1988b, N e u s c h l a i., 1992b).

Pri získavaní údajov o miere jeho toxikologického rizika sa v podmienkach akútnej intoxikácie zaznamenalo, že ovplyvňuje aj energetický metabolizmus jedincov (K a č m á r a i., 1988a). Orientálnym kontrolným vyšetrením trusu sa na konci skrmovacieho experimentu súčasne zaregistroval aj pokles počtu vajčiek nematódov gastrointestinálneho traktu. Z aspektu uvedených zistení sme nemohli vylúčiť ani jeho možný zásah do energetického metabolizmu helmintov.

Uvedené zistenia boli opodstatnením, že sme pristúpili k orientačnému overeniu jeho možného antihelmintického efektu u oviec v pastevných podmienkach so zameraním na gastroenteronematódy.

Herbicíd bentazón je technický produkt československej proveniencie (fy Výskumný ústav chemickej technológie, Bratislava) a líši sa od bentazón zahraničnej proveniencie (SRN) tým, že je syntetizovaný z iných východných produktov. Z chemického hľadiska patrí do širokej skupiny heterocyklických zlúčenín, k diazínom. Ide o 3-izopropyl 1-hydro-2,1,3-benz tiadiazín-4-on-2,2dioxid s molekulovou hmotnosťou 240,3 tohoto štruktúrneho vzorca:



Veľmi slabo sa rozpúšťa vo vode, lepšie v oleji a dobre v acetóne, benzíne, chloroforme a etanole.

MATERIÁL A METÓDA

Pokus sa realizoval v jesennom a jarnom období na jarkách plemena slovenské merino. Jarky boli ustajnené na hlbokú podstielku a denne vyhánané na pastvu. Predmetný herbicíd bentazón (fy Výskumný ústav chemickej technológie, Bratislava) sa v jesennom období aplikoval 7 jarkám v dávke 250 mg/kg ž.h. (asi 3 týždne pred ukončením pastvy, vek 8 mesiacov, hmotnosť $33,0 \pm 5,0$ kg) a v jarnom období 7 jarkám v dávke 500 mg/kg ž.h. (asi 2 týždne po zahájení pastvy, vek 12 mesiacov, hmotnosť $37,5 \pm 4,0$ kg) jednorázovo *per os* sondou, rozpustený v stolovom oleji v pomere 1 : 5. Kontrolným skupinám po 6 jedincov sa aplikoval rovnaký objem stolového oleja.

Účinnosť sa hodnotila na základe kontrolného ovoskopického vyšetrenia trusu na 10. deň po aplikácii predmetného herbicidu. Koprologické vyšetrenie sa robilo floatačnou metódou podľa B r e z u (1957) za použitia roztoku o špecifickej hmotnosti 1300. Stupeň invázie sme hodnotili podľa počtu vajčiek v zornom poli mikroskopu pri 100 násobnom zväčšení. Nález 1 - 10 vajčiek sme hodnotili ako slabú (+), 11 - 50 za strednú (++) a viac ako 50 vajčiek ako silnú inváziu (+++).

VÝSLEDKY

Vplyv herbicidu bentazón na invadovanosť jariiek strongylátmi gastrointestinálneho traktu je uvedený v tab. I.

Z tabuľky vyplýva, že invadovanosť jariiek strongylátmi tráviaceho traktu bola pred aplikáciou bentazónu stredná až silná v oboch sledovaných ročných obdobiach. Kontrolné ovoskopické vyšetrenie trusu na 10. deň po aplikácii predmetného

I. Vplyv herbicidu bentazónu československej proveniencie na invadovanosť jariet strongylátmi gastrointestinálneho traktu – The effects of the herbicide bentazone of Czechoslovak provenience on gastroenteronematode infestations of sheep

Období ¹	Skupina zvířat ²	Počet zvířat ³	Stupeň napadení a počet invadovaných zvířat ⁴							
			před aplikací ⁵				10. den po aplikaci ⁶			
			⁷ negativní	⁸ nízký	⁹ střední	¹⁰ vysoký	⁷ negativní	⁸ nízký	⁹ střední	¹⁰ vysoký
Podzimní ¹¹	ošetřených ¹³	7	0	0	3	4	0	4	3	0
	neošetřených ¹⁴	6	0	0	1	5	0	0	1	5
Jarní ¹²	ošetřených ¹³	7	0	0	4	3	0	4	3	0
	neošetřených ¹⁴	6	0	0	2	4	0	0	1	5

¹season, ²animal group, ³number of animals, ⁴degree and number of invaded animals, ⁵before administration, ⁶day 10 after administration, ⁷negative, ⁸low, ⁹medium, ¹⁰high, ¹¹autumn, ¹²spring, ¹³treated, ¹⁴untreated

herbicidu dokazuje v oboch experimentoch nižšiu invadovanosť jariet v porovnaní s nálezom pred jeho podaním. Pred aplikáciou bentazónu zaregistrovaná stredná až silná invadovanosť poklesla po jeho podaní na strednú až slabú. V závislosti od dávky predmetného herbicidu nepozorujeme rozdiel v navodenom poklese invadovanosti. U jedincov kontrolných skupín v porovnaní s pokusnými neregistrujeme pokles strongylátov.

DISKUSIA

Antihelmintický efekt antihelmintík je sprostredkovaný viacerými mechanizmami. Môže byť navodený ich anticholinesterázovým účinkom s následnou spastickou paralýzou, kurareformným účinkom blokádou acetylcholínu na neuromuskulárnej platničke, potenciovaním GABA s následnou blokádou postsynaptického impulzu a zásahom do energetického metabolizmu helmintov. Energetický metabolizmus helmintov môže byť narušený inhibíciou oxidačnej fosforylácie, ireverzibilnou blokádou príjmu glukózy, resp. inhibíciou tvorby ATP.

Toxikologické štúdie s bentazónom v podmienkach akútnej intoxikácie (po záťaži jedincov letálnymi dávkami) napovedali, že ovplyvňuje aj energetický metabolizmus intoxikovaných jedincov (K a č m á r a i., 1988a). Skutočnosť, že na konci 3-mesačného skrmovania bentazónu sme súčasne (náhodne) zaznamenali pokles invadovanosti jariet (K a č m á r a i., 1988b) nás oprávňovalo predpokladať, že pokles bol navodený samotným bentazónom a nie v dôsledku individuálneho ustajnenia jedincov v kotercoch.

Uvedené zistenia boli dôvodom, že sme nemohli vylúčiť jeho možný zásah do energetického metabolizmu helmintov a opodstatnením, že sme pristúpili

k orientačnému overeniu jeho možného antihelmintického efektu u oviec v pastevných podmienkach so zameraním na gastroenteronematódy.

Z výsledkov orientačného overenia možného antihelmintického efektu herbicidu v pastevných podmienkach vyplýva, že proti strongylátom tráviaceho traktu má nevýrazný účinok. Dokazujú to kontrolné ovoskopické vyšetrenia trusu v oboch experimentoch (jeseň, jar) z ktorých vyplýva, že stredná až silná invadovanosť jariiek zaznamenaná pred jeho aplikáciou poklesla po jeho podaní na strednú až slabú.

V závislosti od jeho dávky (jeseň - 250 mg/kg ž.h., jar - 500 mg/kg ž.h.) sme nezaznamenali rozdiel v účinnosti.

Na antihelmintický efekt herbicidu poukazujú i naše toxikologické štúdie. Na konci jeho 3-mesačného skrmovania (v podmienkach subchronickej intoxikácie) sme tiež zaznamenali pokles invadovanosti oviec.

Predpokladáme, že antihelmintický efekt bentazónu proti strongylátom by mohol súvisieť s ovplyvnením ich energetického metabolizmu inhibíciou tvorby ATP, resp. inhibíciou oxidačnej fosforylácie.

Literatúra

BREZA, M.: Niekoľko praktických poznatkov a námetov k helmintokoprologickej diagnostike. *Helmintológia. Práce z I. konferencie československých helmintológov roku 1956.* Bratislava, vydavateľstvo SAV 1957, s. 57-63.

KAČMÁR, P. - NEUSCHL, J. - LEGÁTH, J. - PORÁČOVÁ, J. - ORIŇÁK, A. - KONRÁD, V. - JANTOŠOVIČ, J.: *Toxikológia nových pesticídov a zdravie zvierat. [Záverečná správa.]* Košice, Vysoká škola veterinárska, 1988a.

KAČMÁR, P. - NEUSCHL, J. - VRZGULA, L. - KONRÁD, V. - JANTOŠOVIČ, J. - MIKULA, I. - ORIŇÁK, A. - BALÁŽ, J. - SITKO, M.: *Toxikologická testácia pesticídu bentazónu u oviec v podmienkach subchronickej intoxikácie. [Záverečná správa.]* Košice, Vysoká škola veterinárska, 1988b.

NEUSCHL, J. - KAČMÁR, P.: Akútna orálna toxicita čsl. vývojového herbicidu bentazónu u oviec a klinická symptomatológia otravy. *Veterinářství*, 42, 1992a, s. 215-216.

NEUSCHL, J. - KAČMÁR, P. - LEGÁTH, J. - TOMÁŠ, J.: Vplyv československého vývojového herbicidu bentazón na niektoré ukazovatele zdravotného stavu oviec v podmienkach subchronickej intoxikácie. *Veter. Med. (Praha)*, 37, 1992b, s. 161-167.

NEUSCHL, J. - KAČMÁR, P.: Akútna orálna toxicita československého vývojového herbicidu bentazón u bažantov a králikov a klinická symptomatológia otravy. *Vet. Med. - Czech.*, 38, 1993, 2, s. 99-105.

Došlo 31. 1. 1992

NEUSCHL, J. - ČIŽMÁROVÁ, J. - LOPUCHOVSKÝ, J. (University of Veterinary Medicine, Košice):

The effects of the herbicide bentazone of Czechoslovak origin on gastroenteronematode infestations of sheep.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (6) : 343-347.

Possible anthelmintic effects of the Czechoslovak herbicide bentazone (Research Institute of Chemical Technology, Bratislava) on gastrointestinal tract strongylates of common occurrence were investigated in sheep of the Slovak Merino breed (housed on deep bedding and put out to grass daily) during the autumn and spring seasons. Our orientation to the investigation of anthelmintic effects of the mentioned herbicide resulted from the fact that its possible intervention in the energy metabolism of helminths could not be excluded, as it was indirectly indicated by our toxicological studies under the conditions of acute and subacute intoxication.

Bentazone was administered at a dose of 250 mg/kg live weight in autumn and 500 mg/kg live weight in the spring season. It was administered *per os* as a single dose in sunflower oil.

A control coprological examination on day 10 following the administration of the herbicide in question indicates the lower invasiveness of sheep in comparison with findings prior to its application (Tab. I) in both experiments (autumn, spring). No marked dose-dependent differences of bentazone efficiency were recorded.

sheep; Czechoslovak herbicide bentazone; anthelmintic effects; strongylates of gastrointestinal tract

Contact Address:

MVDr. Jozef Neuschl, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73,
041 81 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 32111-15, fax 095 767675

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION
Slezská 7 CS 120 56 Praha 2 Czech Republic
Fax: (00422) 25 70 90

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with long summaries in English or in English language with summaries in Czech or Slovak.

Subscription to these journals should be sent to the above-mentioned address.

Periodical	Number of	
	issues per year	pages
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	96
Veterinární medicína (Veterinary Medicine)	12	64
Živočišná výroba (Animal Production)	12	96
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	96
Lesnictví (Forestry)	12	96
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4	80
Ochrana rostlin (Plant Protection)	4	80
Genetika a šlechtění (Genetics and Plant Breeding)	4	80
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	80
Potravinářské vědy (Food Sciences)	6	80

KONCENTRÁCIE CELKOVÝCH LIPIDOV, CHOLESTEROLU A PROGESTERÓNU V ČASE SYNCHRONIZÁCIE RUJE A V PRIEBEHU GRAVIDITY OVIEC

M. Krajničáková, E. Bekeová, V. Hendrichovský, I. Maraček

Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice

V práci sme sa zamerali na sledovanie cholesterolu, celkových lipidov a progesterónu (P_4) v čase synchronizačného ošetrovania a gravidity oviec. Do experimentu bolo zaradených 10 zvierat ustajnených v podmienkach úžitkového chovu. Krv sme odoberali z v. jugularis v deň aplikácie tampónov (0. deň), 3. a 7. deň počas inzercie tampónov, 14. deň pri vyberaní tampónov a injikovaní PMSG, v deň inseminácie, v 7., 14. a 17. deň a v 1., 3. a 4. mesiaci gravidity. Z krvného séra sme stanovili celkové lipidy (CL), cholesterol (CHOL) pomocou BIO-Lachema testov a koncentrácie P_4 súpravou RIA-test-Prog (ÚRVJT Košice). Štatisticky preukazný pokles koncentrácií celkových lipidov v krvnom sére bahnic sme zaznamenali v deň inseminácie ($P < 0,05$) v porovnaní k 0. dňu s hodnotami $1,59 \pm 0,31$ g/l séra. Ich významný pokles ($P < 0,01$) sme zistili v 3. mesiaci gravidity ($1,36 \pm 0,38$ g/l séra). Koncentrácie cholesterolu sa počas pôsobenia Agelin - pošečných tampónov pohybovali na hladinách $1,61 \pm 0,42$ až $1,73 \pm 0,33$ mmol/l séra. Vzostup jeho koncentrácie s hodnotami $1,98 \pm 0,43$ mmol/l séra bol v treťom mesiaci gravidity. Signifikantný pokles koncentrácií P_4 s hodnotami $0,090 \pm 0,091$ mmol/l séra sme zistili v deň inseminácie ($P < 0,05$) v porovnaní k 0. dňu. Od 7. dňa po inseminácii bol zaznamenaný štatisticky významný vzostup do 4. mesiaca gravidity s hodnotami $2,66 \pm 1,18$ až $37,31 \pm 16,56$ mmol/l séra. Nami zistené zmeny v dynamike sledovaných parametrov poukazujú na ich dôležitosť pri vzájomnom prepojení regulačných mechanizmov pôsobiacej pri koncepcii a v gravidite oviec.

ovca; synchronizácia ruje; gravidita; celkové lipidy; cholesterol; progesterón

Stimulácia pohlavného cyklu oviec prostredníctvom biotechnických metód zasahuje do zložitého systému neurohumorálnych regulácií pohlavnej činnosti na rôznej úrovni s ich výslednou koncepciou schopnosťou.

Začiatok vývoja plodu a celý prebeh gravidity je podmienený funkciami orgánových systémov stimulačným alebo inhibičným pôsobením hypofyziárno-ovariálnych a neskôr i placentárnych hormónov. Jedným z hormónov, ktorý je zodpovedný za udržiavanie gravidity je steroidný hormón progesterón.

Substrátom syntézy steroidov je cholesterol produkovaný vaječníkmi alebo získaný z plazmatických frakcií lipoproteínov nízkej a vysokej hustoty (W a n g a G r e e n w a l d, 1984; P a a v o l a a i., 1985), ktorý vzniká hydrolýzou cez 3-hydroxy-3 metylglutaryl koenzymu A reduktázy (P a r i n a u d a i., 1987).

Vzostupom koncentrácie lipoproteínov môže dôjsť k zvýšenej produkcii progesterónu s jeho pozitívnym vplyvom na koncepciu potkanov (A n d e r s e n , 1989). Značné zvýšenie rôznych frakcií lipidov sa zaznamenalo počas gravidity (K n o p p a i., 1973; P o t t e r a i., 1979; E r k o l a a i., 1986). Hyperlipoproteinému po ovariektómii potkanov pozorovali V a n L e n t e n a i. (1983).

Vychádzajúc z hore uvedených skutočností sme sa v predkladanej práci zamerali na štúdium dynamiky zmien koncentrácií progesterónu (P_4), cholesterolu a celkových lipidov počas synchronizácie ruje a gravidity oviec s cieľom získať objektívne údaje uvedených parametrov a ich vzájomných vzťahoch v hodnotenom období.

MATERIÁL A METÓDA

POKUSNÉ ZVIERATÁ

Do sledovania sme zaradili 10 bahnič plemena slovenské merino vo veku 3 až 5 rokov s hmotnosťou 40 - 50 kg. Zvieratá počas experimentu sa držali v podmienkach úžitkového chovu. Kŕmna dávka pre jednotlivé fázy reprodukčného cyklu bola určená podľa ČSN 46 7070. V pripúšťacom období (14. 9. - 24. 9. 1990) sme u zvierat synchronizovali ruju intravaginálnou aplikáciou polyuretánových tampónov s obsahom 20 mg chlórsuperlutinu (Agelin - poševné tampóny, Spofa). Po desiatich dňoch pôsobenia sme tampóny odstránili a ošetrili *i.m.* aplikáciou 500 m.j. PMSG (Bioveta, Ivanovice na Hané) na zviera. Ovce sme inseminovali čerstvým riedeným semenom.

ODBER VZORIEK KRVÍ

Krv sme odoberali z v. *jugularis* v deň aplikácie tampónov (0. deň), 3. a 7. deň počas inzerie tampónov, 14. deň pri vyberaní tampónov a injikovaní PMSG, v deň inseminácie, v 7., 14. a 17. dni a v 1., 2., 3. a 4. mesiaci gravidity. Získané sérum sme uskladnili pri teplote -20 °C až do spracovania.

LABORATORNE ANALÝZY

Koncentrácie progesterónu sme stanovili v krvnom sére súpravou RIA-test-Prog (ÚRVJT, Košice). K stanoveniu koncentrácií cholesterolu a celkových lipidov v krvnom sére sme použili BIO-Lachema-testy (Lachema, Brno).

ŠTATISTICKÉ HODNOTENIE

Štatistickú významnosť rozdielov koncentrácií sledovaných parametrov v jednotlivých dňoch v porovnaní ku dňu aplikácie tampónov (0. deň) sme hodnotili Studentovým *t*-testom. Vzájomnú závislosť zmien sledovaných parametrov sme určili výpočtom korelačného koeficientu (Č e r v e n k a , 1975).

I. Priemerné koncentrácie celkových lipidov (CL), cholesterolu (CHOL) a progesterónu (P₄) v čase synchronizácie a gravidity oviec – The average concentrations of total lipids (CL), cholesterol (CHOL) and progesterone (P₄) during oestrus synchronization and gravidity of sheep

Ukazovateľ ¹	Dni synchronizácie ²				Dni inseminácie ³				Mesiace gravidity ⁴			
	0	3	7	14	1	7	14	17	1	2	3	4
CL (g/l)	2,06	1,63	1,83	1,92	1,59	1,72	1,61	1,74	1,82	1,99	1,36	1,90
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,46	0,37	0,22	0,42	0,31*	0,25	0,63	0,34	0,48	0,38	0,38**	0,22
CHOL (mmol/l)	1,64	1,73	1,71	1,61	1,86	1,61	1,61	1,73	1,75	1,90	1,98	1,70
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,33	0,33	0,24	0,42	0,32	0,43	0,38	0,36	0,27	0,48	0,43	0,36
P ₄ (nmol/l)	2,53	2,54	2,88	0,64	0,09	2,66	3,96	4,37	6,16	10,54	22,84	37,31
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	2,66	2,98	2,05	1,47	0,091*	1,18	2,04	1,77	2,32	5,11**	9,99***	16,56***

Štatistická významnosť porovnávaná k 0. dňu (deň pred synchronizáciou) – Statistical significance compared to day 0 (a day before oestrus synchronization): * = $P < 0,005$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$

¹parameter, ²days of synchronization, ³days of insemination, ⁴months of gravidity

VÝSLEDKY

Štatisticky preukazný pokles koncentrácií celkových lipidov - CL (obr. 1, tab. I) v krvnom sére bahnič sme zaznamenali v deň inseminácie ($P < 0,05$) v porovnaní k 0. dňu (deň pred synchronizačným ošetrením) s hodnotami $1,59 \pm 0,31$ g/l séra. Od 14. dňa po inseminácii do 2. mesiaca gravidity jeho koncentrácie mali vzostupnú tendenciu a pohybovali sa na hodnotách $1,61 \pm 0,63$ až $1,99 \pm 0,38$ g/l séra. Signifikantný pokles koncentrácií celkových lipidov ($P < 0,01$) pod hladinu referenčných hodnôt sme zistili v 3. mesiaci gravidity ($1,36 \pm 0,38$ g/l séra).

Koncentrácie cholesterolu - CHOL (obr. 2, tab. I) sa počas pôsobenia Agelin pošečných tampónov pohybovali na hladinách $1,61 \pm 0,42$ až $1,73 \pm 1,73$ mmol/l séra. Po prechodnom, štatisticky nevýznamnom, vzostupe v čase inseminácie ($1,86 \pm 0,32$ mmol/l) sa jeho koncentrácie udržiavali na úrovni hodnôt $1,61 \pm 0,43$ mmol/l v 7. a 14. dni po inseminácii. Vzostup koncentrácií cholesterolu s jeho najvyššími hladinami $1,98 \pm 0,43$ mmol/l séra bol v 3. mesiaci gravidity.

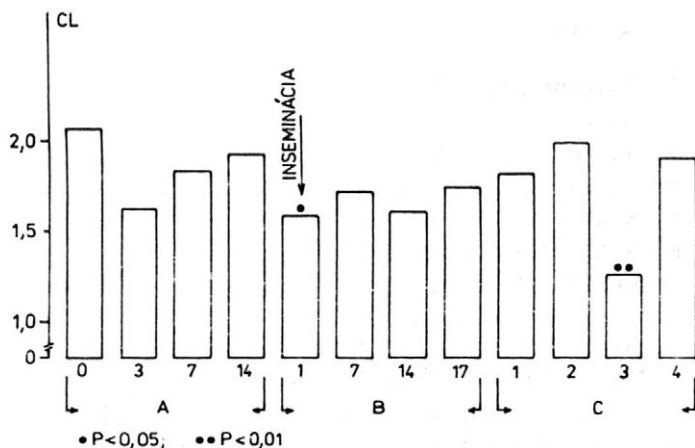
Signifikantný pokles koncentrácií progesterónu - P_4 (obr. 3, tab. I) s hodnotami $0,09 \pm 0,91$ mmol/l séra sme zistili v deň inseminácie ($P < 0,05$) v porovnaní k 0. dňu pred synchronizáciou. Od 7. dňa po inseminácii mali jeho koncentrácie vzostupnú tendenciu so štatisticky preukaznou významnosťou ($P < 0,01$; $P < 0,001$) v 2., 3. a 4. mesiaci gravidity ($2,66 + 1,18$ až $37,31 \pm 16,56$ mmol/l séra).

II. Korelačné hodnotenie vzájomných vzťahov sledovaných parametrov v jednotlivých dňoch – Correlation evaluation of the interrelationships of investigated parameters on particular days

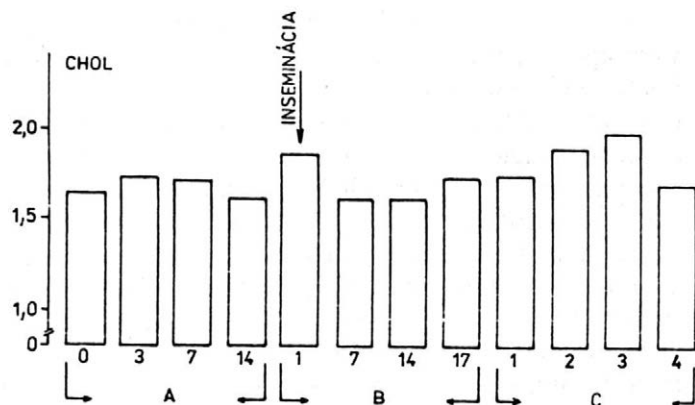
	Korelačná závislosť ¹ (r)		
	CHOL : CL	CHOL : P_4	CL : P_4
0 pred synchronizáciou ²	0,792692	-0,283895	-0,518800
3 po synchronizácii ³	0,450516	-0,023544	-0,143512
7 po synchronizácii	0,595589	-0,497516	-0,152760
14 po synchronizácii	0,260786	-0,265996	-0,023413
Inseminácia ⁴	0,255931	-0,374992	-0,046717
7 po inseminácii ⁵	-0,366323	-0,064740	-0,248626
14 po inseminácii	0,304753	-0,438135	-0,329653
17 po inseminácii	0,772595	-0,398002	-0,109027
Gravidita ⁶			
1. mesiac ⁷	0,688440	-0,270857	-0,384830
2. mesiac ⁸	0,064699	-0,249852	0,277230
3. mesiac ⁹	-	-0,076616	-0,226605
4. mesiac ¹⁰	0,319636	0,216104	-0,267537

¹ correlation dependence, ² before synchronization, ³ after synchronization, ⁴ insemination, ⁵ after insemination, ⁶ gravidity, ⁷ 1st month, ⁸ 2nd month, ⁹ 3rd month, ¹⁰ 4th month

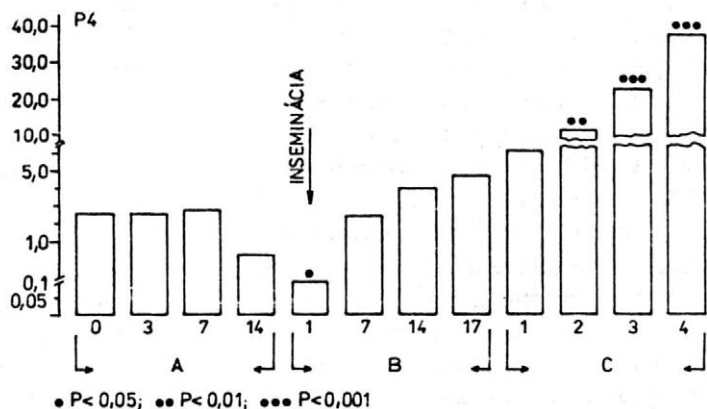
1. Koncentrácie celkových lipidov - CL (g/l) v krvnom sére oviec v čase synchronizácie a gravidity - Total lipid (CL) concentrations (g/l) in the blood serum of sheep during oestrus synchronization and gravidity



2. Koncentrácie cholesterolu - CHOL (mmol/l) v krvnom sére oviec v čase synchronizácie a gravidity - Cholesterol (CHOL) concentrations (mmol/l) in the blood serum of sheep during oestrus synchronization and gravidity



3. Koncentrácie progesterónu - P₄ (nmol/l) v krvnom sére oviec v čase synchronizácie a počas gravidity - Progesterone (P₄) concentrations (nmol/l) in the blood serum of sheep during oestrus synchronization and gravidity



Vysvetlivky pre obr. 1-3 - Explanatory notes to Figs. 1-3:

A = dni synchronizácie - days of synchronization

B = dni inseminácie - days of insemination

C = mesiace gravidity - months of gravidity

Koncentrácie celkových lipidov po prechodnom znížení na 3. deň od ošetrenia pre synchronizáciu ruje boli vystriedané miernym nesignifikantným vzostupom do vysadenia tampónov a štatisticky preukazným poklesom jeho koncentrácií v deň inseminácie. Podobné zistenia dynamiky sledovaného metabolitu udávajú K i m a K a l k h o f f (1975) u krýs a F a h r a e u s a i. (1988) u žien ošetrených estradiolom. Nami pozorované zmeny v dynamike hladín celkových lipidov v uvedenom období môžu byť spôsobené metabolickými a hormonálnymi faktormi, regulujúce metabolizmus tukového tkaniva a tým i pokles lipoproteínovej aktivity ako uvádzajú S t e i n g r i m s d o t t i r a i. (1980).

Dynamika stúpajúcich koncentrácií celkových lipidov do 2. mesiaca gravidity, ktorá bola vystriedaná štatisticky významným poklesom jeho hladín v 3. a 4. mesiaci gravidity, môže byť modulovaná vzájomne sa meniacim pomerom steroidných hormónov, alebo inhibíciou syntézy lipoproteínov zodpovedných za zmeny celkových lipidov plazmy (V a n L e n t e n a i. 1983). Korelačná závislosť celkových lipidov a cholesterolu zistená v 17. dni po inseminácii a v 1. mesiaci gravidity môže mať za následok zníženie ich koncentrácií a následného poklesu cholesterolu.

Koncentrácie cholesterolu počas instalácie Agelin poševných tampónov sa výrazne nemenili. Po vybratí hubiek a aplikácii PMSG sa jeho hladiny v deň inseminácie nesignifikantne zvýšili. Podobné údaje pri štúdiu zmien cholesterolu v priebehu estrálneho cyklu oviec pozorovali T a l a v e r a a i. (1985) ako aj B e k e o v á a i. (1991). Negatívna korelačná závislosť pozorovaná v čase synchronizácie ruje vo vzájomnom vzťahu cholesterolu a progesteronu v našom experimente je porovnateľná s výsledkami počas estrálneho cyklu oviec (R a v a l a i., 1986). Pokles koncentrácií cholesterolu pokračuje so znižovaním nízkodenzitných lipoproteínov (LDL) obsahujúcich apoproteín B, ktorých metabolizmus je úzko spätý s účinkom estrogénov na LDL receptory pre centrálné vychytávanie cholesterolu (B r o w n a i., 1981). V ostatnom čase sú dostupné údaje (F a h r a e u s , 1988) o riadiacom účinku estradiolu na koncentrácie lipidov i lipoproteínov. V súvislosti s tým je pravdepodobné, že znižovanie cholesterolu ku koncu gravidity prechádza zložitou metabolickou cestou modulovanou predovšetkým zvýšeným vzostupom koncentrácií estrogénov a meniacimi sa pomermi obidvoch steroidov ku koncu gravidity, 24 hodín pred pôrodom bahníc (C h a l l i s , 1971; C h a l l i s a i., 1981; M a r a č e k a i., 1984).

Štatisticky preukazné zníženie ($P < 0,05$) hladín progesterónu s jeho najnižšími hodnotami sme zistili po vybratí hubiek a ošetrení zvierat s PMSG v deň inseminácie. Podobné dynamické zmeny v koncentráciách progesterónu pozorovali K a s z t e l a n a i. (1988) indukcií ruje podkožným implantátom s obsahom 375 mg progesterónu a injikovaní PMSG. Nesignifikantný vzostup koncentrácií progesterónu zaznamenaný v 7., 14. a 17. dni po inseminácii je porovnateľný s údajmi dynamických zmien (S e f i d b a k h t a i., 1977). Koncentrácie progesterónových hladín zistené do 2. mesiaca gravidity poukazujú na dôležitosť žltého teľieska na začiatku gravidity oviec (S t a b e n f e l d t a i., 1972). Po 60. dni gravidity bahníc je produkcia progesterónu placentárneho pôvodu a ovariektómia môže byť vykonaná bez toho, aby došlo k abortu (K u d l á č a E l e č k o , 1987).

Štatisticky významný vzostup koncentrácií progesterónu ($P < 0,01$; $P < 0,001$) zaznamenaný do 4. mesiaca gravidity je porovnateľný s dynamikou jeho koncentrácií zaznamenaných u oviec do 135. dňa gravidity (S t a b e n f e l d t a i., 1972).

Dosiahnuté výsledky poukazujú na dôležitosť biologického komplexu sledovaných parametrov pri vzájomnom prepojení regulačných mechanizmov pôsobiacich pri koncepcii a počas gravidity oviec.

L i t e r a t ú r a

ANDERSEN, G. E.: Influence of dietary fat intake during infancy upon serum lipids and lipoproteins. *Acta paed. scand.*, 351, 1989, s. 72-75.

BEKEOVÁ, E. - KRAJNÍČÁKOVÁ, M. - HENDRICHOVSKÝ, V. - MARAČEK, I.: Vplyv synchronizačného ošetrovania v sezónnom období a v gravidite oviec na koncentrácie tyroxínu, trijódtyronínu, 17 beta-estradiolu, progesterónu a cholesterolu. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991, 433-444.

BROWN, M. S. - KOVANEN, P. T. - GOLDSTEIN, J. L.: Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, 212, 1981, s. 628-635.

ČERVENKA, J.: Základy štatistiky, Martin, Osveta 1975, s. 67-99.

ERKKOLA, R. - VIIKARI, J. - IRJALA, K. - SOLAKIVI-JAAKKOLA, T.: One-year follow-up of lipoprotein metabolism after pregnancy. *Biol. Res. Pregnancy*, 7, 1986, s. 47-51.

FAHRAEUS, L.: The effects of estradiol on blood lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *Obstet. Gynec.*, 72, 1988, s. 180-220.

CHALLIS, J. R. G.: Sharp in free circulating oestrogens immediately before parturition in sheep. *Nature*, 229, 1971, s. 208.

CHALLIS, J. R. G. - PATRICK, J. E. - CROSS, J. - WORKENYCH, J. - MANCHESTER, E. - POWER, S.: Short-term fluctuation in the concentrations of cortisol and allantoic progesterone in fetal plasma, maternal plasma, amniotic and allantoic fluids from sheep during late pregnancy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59, 1981, s. 261.

KASZTELAN, R. - STUPNICKY, R. - ZEBRACKI, A.: Poziomy LH i progesteronu u oviec z ruzja indukovaná poza sezonem rozrodcym. *Met. Weter.*, 41, 1988, s. 497-498.

KIM, H. J. - KALKHOFF, R. K.: Sex steroid influence on triglyceride metabolism. *J. clin. Invest.*, 56, 1975, s. 888-896.

KNOPP, R. H. - WARTH, M. R. - CARROLL, C. J.: Lipid metabolism in pregnancy. I. Changes in lipoprotein triglyceride and cholesterol in normal pregnancy and the effects of diabetes mellitus. *J. Reprod. Metab.*, 10, 1973, s. 95-107.

KUDLÁČ, E. - ELEČKO, J.: Veterinární porodnictví a gynekologie, Praha, SZN 1987.

MARAČEK, I. - HENDRICHOVSKÝ, V. - BEKEOVÁ, E. - JUŠÍKOVÁ, A. - KRAJNÍČÁKOVÁ, M. - KSENZAKOVIČ, J.: Indukcia bahnenia estradiolom domácej proveniencie. *Biol. chem. veter. (Praha)*, 20, 1984, s. 539-546.

PAAVOLA, L. G. - STRAUSS, J. F. - BOYD, CH. O. - NESTLER, J. E.: Uptake of gold-and (^3H) cholesteryl linoleate-labeled human low density lipoprotein by cultured rat granulosa cells: Cellular mechanism involved in lipoprotein metabolism and their importance to steroidogenesis. *J. cell. Biol.*, 100, 1985, s. 1235-1247.

PARINAUD, J. - PERRET, B. - RIBEES, H. - CHAP, H. - PONTONNIER, G. - DOUSTE-BLAZY, L.: High density lipoprotein and low density lipoprotein utilization by human granulosa cells for progesterone synthesis in serum-free culture: Respective contributions of free and esterified cholesterol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 64, 1987, s. 409-417.

POTTER, J. M. - NESTEL, P. J.: The hyperlipidemia of pregnancy in normal and complicated pregnancies. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 133, 1979, s. 165-172.

- RAVAL, C. V. S. - SINGH, R. - LUKTURE, S. N.: Serum cholesterol level during different phases of oestrus cycles in Muzaffarnagari sheep. *Indian J. anim. Sci.*, 56, 1986, s. 1205-1211.
- SEFIDBAKHT, N. - MOSTAFAVI, M. S. - FARID, A.: Effect of season of lambing on postpartum ovulation, conception and follicular development of four fat-tailed Ironion breeds of sheep. *J. anim. Sci.*, 45, 1977, s. 305-310.
- STABENFELDT, G. H. - DROST, M. - FRANTI, C. E.: Peripheral plasma progesterone levels in the ewe during pregnancy and parturition. *Endocrinology*, 90, 1972, s. 144-150.
- STEINGRIMSDOTTIR, L. - BRASEL, J. - GREENWOOD, M. R. C.: Hormonal modulation of adipose tissue lipoprotein lipase may alter intake in rats. *Amer. J. Physiol.*, 239, 1980, 162-167.
- TALAVERA, F. - PARK, C. S. - WILLIAMS, G. L.: Relationship among dietary lipid intake serum cholesterol and ovarium function in Holstein heifers. *J. anim. Sci.*, 60, 1985, s. 1045-1052.
- VAN LENTEN, B. J. - MELCHIOR, G. W. - ROHEIM, P. S.: Lipoprotein metabolism in the ovariectomized rat. *Lipid. Res.*, 24, 1983, s. 1475-1484.
- WANG, S. CH. - GREENWALD, G. S.: Effect of lipoproteins, 25-hydroxycholesterol and luteinizing hormone on *in vitro* follicular steroidogenesis in the hamster and rat. *Biol. Reprod.*, 31, 1984, s. 271-279.

Došlo 9. 11. 1992

KRAJNÍČÁKOVÁ, M. - BEKEOVÁ, E. - HENDRICHOVSKÝ, V. - MARÁČEK, I. (Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice):

Concentrations of total lipids, cholesterol and progesterone in the period of oestrus synchronization and during gravidity of sheep.

Vet. Med. - Czech., 38, 1993 (6) : 349-357.

Our investigations were concerned with dynamic changes in total lipids (CL), cholesterol (CHOL) and progesterone (P_4) in blood serum of sheep in the period of oestrus synchronization treatment and during mating and gravidity. Our experiment was carried out using 10 animals housed under the conditions of productive rearing. Blood samples were taken from *v. jugularis* on day of swab application (day 0) and on days 3 and 7 of the action of Agelin vaginal swabs, on day of insemination, and on days 7, 14, 17 and in the 2nd, 3rd and 4th month of gravidity. Blood serum was used to determine total lipids and cholesterol by means of Bio-Lachema tests, and P_4 concentrations employing RIA-test-Prog kits (ÚRVJT, Košice). A statistically significant decrease in concentrations of total lipids (Fig. 1, Tab. I) in sheep blood serum was recorded on day of insemination ($P < 0.05$) compared to day 0, with the value 1.59 ± 0.31 g/l of serum, and in the 3rd month of gravidity ($P < 0.01$), at concentrations 1.36 ± 0.38 g/l of serum. The determined decrease in their values in the mentioned period can be modulated by the mutually changing ratio of steroid hormones or by inhibition of synthesis of lipoproteins responsible for changes in total plasma lipids. Changes in cholesterol concentrations (Fig. 2, Tab. I) during the introduction of swabs were insignificant and ranged from 1.60 ± 0.42 to 1.73 ± 0.33 mmol/l of serum. An insignificant increase in cholesterol concentrations ($P < 0.05$), with its highest levels 1.98 ± 0.43 mmol/l of serum, was recorded in the 3rd month of gravidity. A statistically significant decrease ($P < 0.05$) in progesterone levels and its lowest values (Fig. 3, Tab. I) were recorded after the removal of swabs and treatment of animals with PMSG on day of insemination. Starting from

the 7th day after the insemination a statistically significant increase in its values ($P < 0.01$; $P < 0.001$) was observed to the end of the investigated period, with concentrations ranging from 2.66 ± 1.18 to 37.31 ± 16.56 mmol/l of serum. Concentrations of progesterone levels, determined to the 2nd month of gravidity, point to the importance of the *corpus luteum* at the onset of sheep gravidity. After the 60th day of ewe gravidity, the production of progesterone is of placental origin, as it is also confirmed by literary data (K u d l á č , E l e č k o , 1987) suggesting that ovariectomy can be carried out without abortion. The investigated parameters are important in view of mutual interconnections of regulation mechanisms during the observed period.

sheep; oestrus synchronization; gravidity; total lipids; cholesterol; progesterone

Contact Address:

MVDr. Maria K r a j n i č á k o v á , CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny,
Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovak Republik
Tel. 095 37429, fax 095 31853

Upozornění pro přispěvatele časopisu

Veterinární medicína

V rámci modernizace výroby přechází naše redakce na vydávání časopisu pomocí DTP. Autory, kteří chtějí publikovat svoje příspěvky v časopise Veterinární medicína a mají možnost je pořizovat na PC, proto žádáme, aby texty příspěvků posílali současně s disketou. Po zkopírování textu bude diska vrácena zpět autorům.

Pro zpracování textu pomocí DTP je pro nás nejvhodnější textový editor T602. Pokud používáte jiný editor, prosíme o převedení do souboru v ASCII kódu. Obrázky pořizované počítačem je možno publikovat přímo, pokud jsou v souboru .TIF.

Pořizování příspěvků na PC není podmínkou pro přijetí do tisku, to znamená, že redakce bude i nadále přijímat příspěvky pořizované na psacím stroji.

Doufáme, že toto opatření se u autorů setká s příznivým ohlasem.

Redakce časopisu

ALKALICKÁ FOSFATÁZA V PUERPÉRIU BAHNÍC A JEJ VZŤAH K HORMÓNOM ŠTÍTNEJ ŽIAZY A OVARIÁLNYM STEROIDOM

E. Bekeová, M. Krajničáková, V. Hendrichovský, I. Maraček

Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice

Práca je zameraná na štúdium zmien dynamiky koncentrácií alkalické fosfatázy (ALP), tyroxínu (T_4), trijódtyronínu (T_3), 17 beta-estradiolu (E_2), progesterónu (P_4) a ich vzájomnej korelácie v systémovej krvi bahníc počas prvých 51 dní po pôrode za účelom zistenia závislosti zmien v dynamike ovariálnych steroidov od aktuálnych systémových koncentrácií ALP, T_4 a T_3 počas puerpéria bahníc. Sledovanie sme robili u 9 dojčiacich bahníc plemena slovenské merino, po 2. - 3. bahnení s hmotnosťou 40 - 50 kg, obahnených v prvej dekáde februára, kŕmených podľa ČSN 46 7070. Krv sme odoberali punkciou v. jugularis v intervaloch 24 h (-1. deň) pred pôrodom (a.p.), do 36. h po pôrode (p.p.), v 4., 7., 17., 21., 25., 34., 42. a 51. dni p.p. Koncentrácie ALP, T_4 , T_3 , E_2 a P_4 sme stanovili komerčnými súpravami LACHEMA-test (LACHEMA, n.. Brno), RIA-test- T_4 , RIA-test-ESTRA a RIA-test-PROG (ÚRVJT, Košice). V porovnaní k -1. dňu mali koncentrácie ALP do 17. dňa a koncentrácie T_4 a T_3 do 21. dňa štatisticky nepreukazne klesajúcu tendenciu. Koncentrácie E_2 a P_4 po poklese už v 36. h pozorovania ($P < 0,001$, $P < 0,001$) sa na signifikantne nižších hodnotách v porovnaní k -1. dňu udržiavali až do konca sledovania. V koncentráciách ALP po 17. dni a v koncentráciách T_4 a T_3 po 21. dni sme zaznamenali pozvoľný, v porovnaní k -1. dňu nesignifikantný, nárast s pretrváváním do 51. dňa p.p. Signifikantnosť korelácie sme zaznamenali vo vzťahoch T_4 : ALP ($P < 0,001$) v 51. dni, ALP : P_4 a ALP : E_2 v 17. a 42. dni p.p. ($P < 0,05$). Z výsledkov usudzujeme, že placentárna ALP aj napriek jej pretrvávaniu v systémovej krvi, v podstatnej miere dynamiku ovariálnych steroidov v ranom puerpériu neovplyvňuje.

bahnica; puerpérium; alkalická fosfatáza; tyroxín; trijódtyronín; 17 beta-estradiol; progesterón

Alkalická fosfatáza (ALP) - ortofosforický monoester fosfohydrolázy je značne rozšíreným enzýmom v cicavčích tkanivách. Mimo čriev, obličiek a kostí bola jej vysoká aktivita dokázaná v placentе v druhej polovici gravidity. V krvnom sére možno izoenzýmy ALP dokázať do troch týždňov po pôrode (F e r n l e y, 1971; O y a, 1985). Placenta, podobne ako stena čriev, zohráva významnú úlohu v transporte lipidov a podľa zistení autorov C o l e m a n a H a y n s (1984) v experimentoch *in vitro* je placenta krýs orgánom s vysoko aktívnym metabolizmom triacylglycerolov. U žien bola dokázaná účasť placentárnej alkalické fosfatázy pri hydrolýze fosfatidov na diglyceridy a anorganické fosfáty (S u m i k a v a a i., 1987). Hydrolýza fosfatidov je nevyhnutná pre biosyntézu, resp. resyntézu triacylglycerolov. Lipoproteíny zastávajú významné miesto v steroidogéze ako zdroje

primárneho prekursoru syntézy steroidov (cholesterolu) v placentе a ováriách (Knopp a i., 1986; Grummer a Carroll, 1988).

Súbežne pri štúdiu riadenia mobilizácie tuku z tukového tkaniva sa zistilo, že resyntéza triacylglycerolov je závislá i od poolu voľných mastných kyselín (FFA) v tukovom tkanive a tento je určujúcim faktorom hladiny FFA cirkulujúcich v plazme. Koncentrácia FFA v plazme reguluje zasa príjem FFA ostatnými tkanivami a ich aktiváciu na Acyl-CoA. Acyl-CoA je spolu s glycerolom základnou zložkou syntézy triacylglycerolov. Enzýmy zaradené v lipolýze a v uvoľňovaní FFA z tukového tkaniva sú mimo iných ovplyvňované hormónmi štítnej žľazy a TSH (Mayes, 1977).

Vychádzajúc z uvedeného sme sa v predkladanej práci zamerali na sledovanie zmien koncentrácií alkalickéj fosfatázy, tyroxínu, trijódtyronínu, 17 beta-estradiolu, progesterónu a ich vzájomnej korelačnej závislosti v systémovej krvi oviec od prvých postpartálnych dní do 51. dňa po pôrode za účelom zistenia možného vplyvu placentárnej alkalickéj fosfatázy, resp. jej vzťahov s hormónmi štítnej žľazy na syntézu ovariálnych steroidov počas puerpéria bahnic.

MATERIÁL A METÓDY

POKUSNÉ ZVIERATÁ

Do experimentu sme zaradili deväť oviec plemena slovenské merino s priemernou hmotnosťou 40-50 kg, obahnených v prvej dekáde februára. Počas bahnienia i celého experimentu boli bahnice spolu s jahňatami chované v ovčine staršieho klasického typu na hlbokей podstielke. Krmná dávka, vybilancovaná podľa ČSN 46 7070, pozostávala zo siláže, sena repy a prídavku krmnej zmesi BAK. Voda a dobytčia soľ boli podávané *ad libitum*.

ODBER BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Vzorky krvi sa odoberali punkciou v. *jugularis* medzi 8.00 a 10.00 hodinou. Odber prvej vzorky krvi bol vykonaný 24 h (-1. deň) pred pôrodom (*a.p.*), s ďalšími odbermi sa pokračovalo v 36. h po pôrode, v. 4., 7., 14., 17., 21., 25., 34., 42. a 51. dni po pôrode (*p.p.*). Krv bola po odbere zcentrifugovaná a krvné séra uskladnené pri -18 °C až do spracovania.

ANALYTICKÉ METÓDY

Koncentrácie alkalickéj fosfatázy (ALP) sme stanovili LACHEMA-testom (LACHEMA, Brno). K rádioimunologickému stanoveniu koncentrácií tyroxínu (T_4), trijódtyronínu (T_3), 17 beta-estradiolu (E_2), progesterónu (P_4) sme použili komerčné súpavy RIA-test- T_4 , RIA-test- T_3 , RIA-test-ESTRA, RIA-test-PROG (ÚRVJT, Košice).

MATEMATICKO-ŠTATISTICKÉ ANALÝZY

Štatistickú významnosť diferencií medzi -1. dňom a ďalšími dňami experimentu sme hodnotili Studentovým *t*-testom. Vzájomnú závislosť sledovaných parametrov sme určili výpočtom korelačného koeficientu (*r*) a jeho štatistickej významnosti.

VÝSLEDKY

V porovnaní k hodnotám $2,6 \pm 1,08 \mu\text{kat/l}$ séra zistených v -1. deň sme v 36. h po pôrode zaznamenali v koncentráciách ALP (tab. I, obr. 1) mierny pokles. Po vzostupe v 4. a 7. popôrodnom dni, v porovnaní k -1. dňu nesignifikantnom, mali jeho koncentrácie klesajúcu tendenciu so štatisticky nepreukazne najnižšími hodnotami v 17. dni po obahnení ($1,34 \pm 0,97 \mu\text{kat/l}$). Po 17. dni sme v koncentráciách ALP zaznamenali mierne vzostupnú tendenciu so sinusoidálnym priebehom krivky. Úroveň hodnôt z -1. dňa však nedosiahli.

Koncentrácie T_4 (tab. I, obr. 2) sa v -1. dni a v 36. h po pôrode pohybovali na temer rovnakých hladinách ($59,4 \pm 9,69$ a $60,68 \pm 23,44 \text{ nmol/l}$ séra). Ich výrazný, v porovnaní k -1. dňu však nesignifikantný zostup sme pozorovali v 4. dni po pôrode ($45,66 \pm 21,61 \text{ nmol/l}$ séra). Prechodný, štatisticky nepreukazný vzostup v 7. dni vystriedal opätovný pokles jeho koncentrácií s najnižšími hodnotami v 21. dni po obahnení ($54,89 \pm 11,06 \text{ nmol/l}$ séra; $P > 0,05$). Po 21. dni nadobudli jeho koncentrácie charakter trvalého vzostupu. Najvyššie hodnoty ($73,02 \pm 16,24 \text{ nmol/l}$, $P > 0,05$) dosiahli v 51. dni po pôrode.

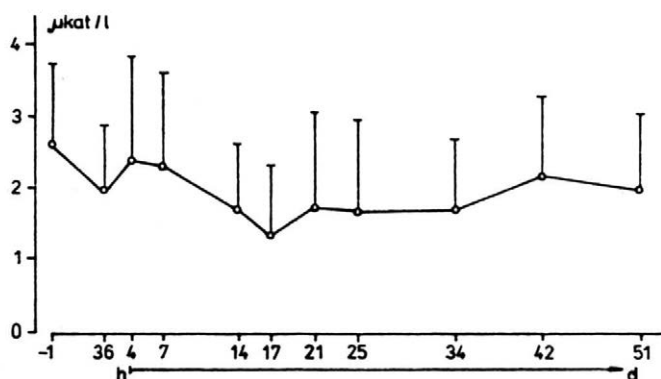
I. Koncentrácie alkalické fosfatázy (ALP), tyroxínu (T_4), trijódtyronínu (T_3), 17 beta-estradiolu (E_2) a progesterónu (P_4) v krvnom sére bahnic v popôrodnom období – The concentrations of alkaline phosphatase (ALP), thyroxine (T_4), triiodothyronine (T_3), 17 beta-oestradiol (E_2) and progesterone (P_4) in the blood serum of ewes in the puerpary

Dni ¹	Koncentrácie ²				
	ALP ($\mu\text{kat/l}$)	T_4 (nmol/l)	T_3 (nmol/l)	E_2 (nmol/l)	P_4 (nmol/l)
-1.	$2,60 \pm 1,08$	$59,40 \pm 9,69$	$1,22 \pm 0,33$	$2,45 \pm 0,65$	$9,46 \pm 3,44$
36 h	$1,96 \pm 0,94$	$60,68 \pm 23,44$	$1,48 \pm 0,34$	$0,30 \pm 0,24^*$	$0,05 \pm 0,08^*$
4.	$2,37 \pm 1,41$	$45,66 \pm 21,61$	$1,17 \pm 0,36$	$0,17 \pm 0,09^*$	$0,06 \pm 0,01^*$
7.	$2,30 \pm 1,27$	$66,38 \pm 13,57$	$1,39 \pm 0,50$	$0,19 \pm 0,09^*$	$0,07 \pm 0,1^*$
14.	$1,70 \pm 0,91$	$61,48 \pm 25,54$	$0,99 \pm 0,54$	$0,13 \pm 0,09^*$	$0,03 \pm 0,07^*$
17.	$1,34 \pm 0,97$	$60,79 \pm 17,97$	$0,94 \pm 0,55$	$0,20 \pm 0,27^*$	$0,04 \pm 0,10^*$
21.	$1,73 \pm 1,33$	$54,89 \pm 11,06$	$0,85 \pm 0,32$	$0,15 \pm 0,12^*$	$0,06 \pm 0,16^*$
25.	$1,66 \pm 1,26$	$64,68 \pm 20,08$	$1,04 \pm 0,59$	$0,08 \pm 0,07^*$	$0,04 \pm 0,14^*$
34.	$1,70 \pm 0,96$	$72,84 \pm 17,44$	$1,16 \pm 0,43$	$0,12 \pm 0,07^*$	$0,96 \pm 2,82^*$
42.	$2,18 \pm 1,09$	$69,81 \pm 15,54$	$1,21 \pm 0,43$	$0,24 \pm 0,15^*$	$0,05 \pm 0,08^*$
51.	$2,00 \pm 1,05$	$73,02 \pm 16,24$	$1,24 \pm 0,44$	$0,20 \pm 0,15^*$	$0,02 \pm 0,07^*$

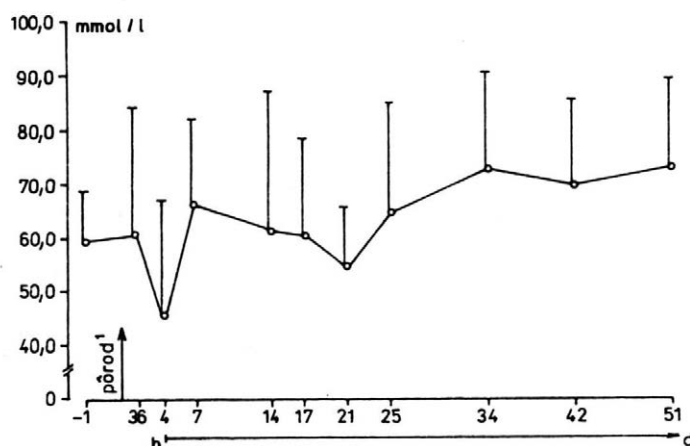
Signifikantnosť diferencií medzi -1. dňom a ostatnými dňami sledovania hodnotená Studentovým *t*-testom – The significance of differences between day -1 and the other days of observation evaluated by Student's *t*-test

* = $P < 0,001$

¹ days, ² concentrations



1. Koncentrácie alkalickéj fosfatázy ($\mu\text{kat/l}$) v popôrodnom období u bahnic – Alkaline phosphatase concentrations ($\mu\text{kat/l}$) in ewes in the puerpery

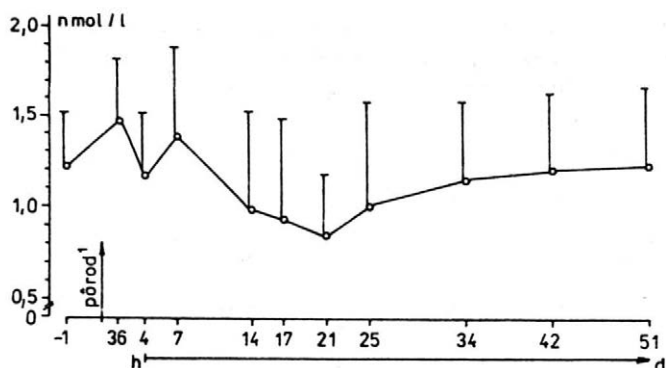


2. Koncentrácie tyroxínu (nmol/l) v popôrodnom období u bahnic – Thyroxine concentrations (nmol/l) in ewes in the puerpery

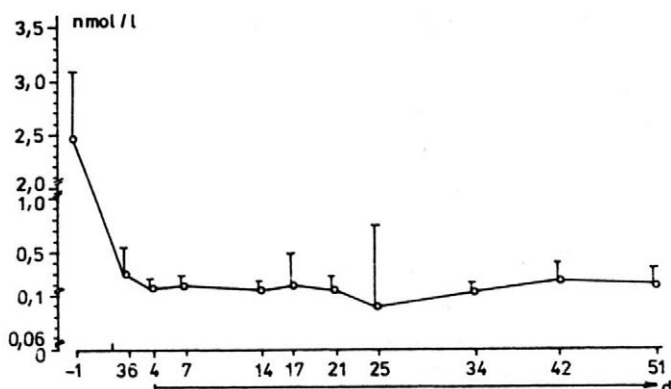
V porovnaní k hodnotám $1,22 \pm 0,33 \text{ nmol/l}$ séra zistených v -1. dni sme v 36. h a 7. dni zaznamenali v koncentráciách T_3 (tab. I, obr. 3) nesignifikantný nárast s najvyššími hodnotami $1,48 \pm 0,34 \text{ nmol/l}$ séra v 36. h po obahnení. Medzi 14. a 21. popôrodným dňom mali jeho koncentrácie klesajúcu tendenciu ($P > 0,05$), pohybovali sa na úrovni hodnôt $0,85 \pm 0,32$ až $0,99 \pm 0,55 \text{ nmol/l}$ séra. Po štaticky nepreukaznom vzostupe pozorovanom v 25. dni mali koncentrácie T_3 charakter mierneho, trvalého vzostupu až do konca sledovania. Úroveň východných hodnôt dosiahli v 51. dni experimentu.

V -1. dni sledovania sa koncentrácie E_2 (tab. I, obr. 4) pohybovali na hladinách $2,45 \pm 0,65 \text{ nmol/l}$ séra. V 36. h po pôrode hodnoty jeho koncentrácií prudko poklesli k hodnotám $0,30 \pm 0,24 \text{ nmol/l}$ séra ($P < 0,001$). Od 4. popôrodného dňa až do ukončenia sledovania sa jeho hodnoty pohybovali na pomerne vyrovnaných a v porovnaní k -1. dňu signifikantne nižších hladinách ($P < 0,001$). Vyrovnanosť hladín bola prerušená miernym prechodným zvýšením jeho koncentrácií v 17. a 42. dni po pôrode k hodnotám $0,20 \pm 0,27$ a $0,24 \pm 0,15 \text{ nmol/l}$ séra. Smerodajná odchýlka však naznačuje širokú variáciu individuálnych hodnôt.

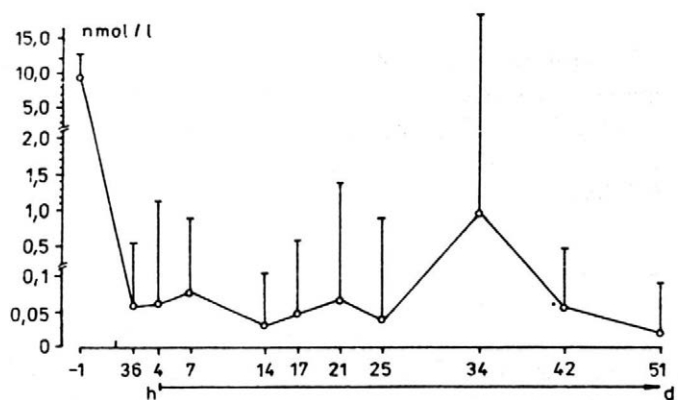
3. Koncentrácie trijódtyronínu (nmol/l) v popôrodnom období u bahnic – Triiodothyronine concentrations (nmol/l) in ewes in the puerperry



4. Koncentrácie 17 beta-estradiolu (nmol/l) v popôrodnom období u bahnic – 17 beta-oestradiol concentrations (nmol/l) in ewes in the puerperry



5. Koncentrácie progesterónu (nmol/l) v popôrodnom období u bahnic – Progesterone concentrations (nmol/l) in ewes in the puerperry



V koncentráciách P_4 (tab. I, obr. 5) sme podobne ako u E_2 pozorovali prudký pokles jeho koncentrácií z hodnôt $9,46 \pm 3,44$ nmol/l séra, zistený v -1. dni na úroveň $0,05 \pm 0,08$ nmol/l séra, $P < 0,01$ už v 36. h po pôrode. S výnimkou epizodického vzostupu zistenom v 34. popôrodnom dni ($0,96 \pm 2,82$ nmol/l séra) so širokým rozptylom individuálnych hodnôt sme podstatnejšie zmeny v jeho koncentráciách nezistili.

II. Vzťah alkalickéj fosfatázy (ALP) k tyroxínu (T_4), trijódtyronínu (T_3) 17 beta-estradiolu (E_2) a progesterónu (P_4) vyjadrený korelačným koeficientom (r) – The relationship of alkaline phosphatase (ALP) to thyroxine (T_4), triiodothyronine (T_3), 17 beta-oestradiol (E_2) and progesterone (P_4) characterized by correlation coefficient (r)

Dni ¹	Korelačný koeficient ² (r)			
	ALP : T_4	ALP : T_3	ALP : E_2	ALP : P_4
-1.	-0,1868	0,1424	0,7814	0,3895
36. h	-0,2816	0,0391	0,3391	-0,4675
4.	-0,4850	-0,0291	0,6257	0,1604
7.	-0,4008	-0,1835	-0,2933	-0,5166
14.	-0,4805	0,1537	-0,3646	-0,1423
17.	-0,0475	0,0272	0,0351	0,7197*
21.	0,0428	0,4642	0,6171	-0,3030
25.	-0,3871	-0,0578	0,0923	-0,3667
34.	-0,5423	-0,2009	0,1066	-0,3415
42.	-0,4954	0,0246	0,7096*	-0,5563
51.	0,9023***	0,5627	0,5089	-0,4991

* = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$

¹days, ²correlation coefficient

Pri korelačnom hodnotení vzťahov sledovaných parametrov (tab. II) sme zaznamenali tesnú, štatisticky preukaznú pozitívnu korelačnú závislosť vo vzťahu T_4 : ALP ($r = 0,9023$; $P < 0,001$), ale až v 51. dni po pôrode a tiež vo vzťahoch ALP : P_4 v 17. dni ($r = 0,7197$; $P < 0,05$) a ALP : E_2 v 42. dni po obahnení ($r = 0,7096$; $P < 0,05$).

DISKUSIA

Pri zovšeobecňujúcom hodnotení dynamických zmien sledovaných parametrov môžeme konštatovať, že koncentrácie ALP mali v porovnaní k -1. dňu klesajúcu tendenciu až do 17. dňa po pôrode. Zostupný charakter pretrvávajúci do 21. dňa s výnimkou epizodického, štatisticky nepreukazného vzostupu v 7. dni, sme zaznamenali aj v koncentráciách T_4 . Podobnú klesajúcu tendenciu s prechodným, nepreukazným, dvojrýchlovým vzostupom v 36. h a 7. dni mali i koncentrácie T_3 . V koncentráciách oboch steroidných hormónov E_2 a P_4 sme zistili signifikantný pokles ($P < 0,001$) už v 36. h po obahnení. Odhliadnúc od náznakovitého zvýšenia hodnôt E_2 v 17. a 42. dni a epizodického vzostupu P_4 v 34. dni sledovania sa koncentrácie oboch steroidov udržiavali na hladinách signifikantne nižších ako v -1. dni.

V koncentráciách ALP po 17. dni a v koncentráciách T_4 a T_3 po 21. dni sme zaznamenali pozvoľný, vzhľadom k -1. dňu nesignifikančný nárast pretrvávajúci do 51. dňa po pôrode.

V dostupnej literatúre sme sa s prácami, ktoré riešia úlohu ALP a jej vzťah k hormónom štítnej žľazy a ovariálnym steroidom v popôrodnom období nestretli. Väčšina prác je orientovaná na štúdium jej významu počas estrálneho cyklu, resp. gravidity.

Z experimentálnych prác robených predvážne u gravidných žien vyplýva, že koncentrácie placentárnych izoenzýmov ALP sa začínajú zvyšovať v priebehu druhého a tretieho trimestra gravidity (F i s h m a n a i., 1972). Ako katalyzátory hydrolýzy fosfatidov pravdepodobne participujú na syntéze progesterónu a estrogénov v placentе (C o l e m a n a H a y n e s, 1984; S u m i k a w a a i., 1987). V čase gravidity by teda ALP a jej izoenzýmy bolo možné považovať za jeden z protektorujúcich faktorov gravidity. Podľa doterajších poznatkov z humánnej medicíny (K a d l e c, 1990) po odbúraní fetoplacentárnej jednotky, ako jej priameho zdroja, vymizne zo séra do troch týždňov po pôrode. S uvedenou skutočnosťou pravdepodobne súvisí i pozvoľný popôrodný pokles koncentrácie ALP s najnižšími hodnotami v 17. dni v našom experimente. V rozpore s poznatkami, ktoré udáva K a d l e c (1990), však v našom pozorovaní sme nezistili absolútny pokles koncentrácií ALP a navyše sa jej koncentrácie po 17. dni začali pozvoľne zvyšovať. Dôvod zachovania určitých systémových koncentrácií vidíme v nízkej špecifite nami použitého testu. Pozvoľný vzostup ALP po 17. popôrodnom dni si vysvetľujeme nástupom postupnej popôrodnej reštaurácie celej hypotalamo-adenohypofyzárnej osi (N e t t, 1987; W a l l a c e a i., 1989; S c h i r a r a i., 1990). Hypotéza o súvisi medzi aktiváciou hypotalamo-adenohypofyzárnej osi a pozvoľným vzostupom ALP môže byť nepriamo doložená výsledkami experimentov, v ktorých sa zistilo, že aktivita ALP bovinného uteru je regulovaná ovariálnymi steroidmi. U progesterónu bolo dokázané stimulačné a u 17 beta-estradiolu inhibičné pôsobenie na aktivitu ALP (B o o s a i., 1988; W i t k o w s k i a i., 1989). V porovnaní k folikulárnej fáze dojnic a byvolíc sa signifikantne vyššia aktivita endometriálnej aktivity ALP dokázala počas luteálnej fázy pohlavného cyklu (L a r s o n a i., 1970; B u g a l i a a S h a r m a, 1990). V súlade s uvedenými zisteniami je nami zaznamenaná pozitívna korelačná závislosť vo vzťahu ALP : P_4 v 17. dni. Či vzostup ALP, pozitívna korelačná závislosť a náznakovité zvýšenie P_4 práve v 17. dni súvisí so začiatkom ovariálnej aktivácie jednoznačne zodpovedať nemôžeme.

Pokles, ktorý sme s výnimkou epizodického vzostupu pozorovali u oboch tyroïdných hormónov do 21. dňa po pôrode je v zhode so zisteniami u dojnic, ošipáných a kôz (K e s l e r a i., 1981; B e n j a m i n s e n, 1981; R i i s a M a d s e n, 1985). Popôrodná depresia systémových koncentrácií tyroïdných hormónov je podľa doterajších poznatkov spôsobená ich redistribúciou do mliečnej žľazy a hyposekreciou tyroidei (F u k u d a a i., 1980; R i i s a M a d s e n, 1985). Pretrvávajúce klesanie jódtyronínov v prvých dňoch po pôrode pravdepodobne zaujíma významné postavenie vo vyrovnávaní energetického deficitu pri iniciácii laktácie a cez stimulácie 5 alfa-reduktázového systému, bráni predčasnej

konceptii. Túto problematiku podrobnejšie diskutujeme v našich skôr publikovaných prácach (B e k e o v á i., 1991, 1992), v ktorých sme dospeli k záveru, že v popôrobnom období a v čase laktácie dochádza u oviec k dočasnému prerušeniu vzájomných tyroideo-ovariálnych vzťahov a hormóny štítnej žľazy sa v tomto období stávajú súčasťou energie-mobilizujúceho a homeostaticko-adaptačného komplexu organizmu. Keď vezmeme do úvahy skutočnosť, že ALP katalyzuje hydrolýzu fosfomonoesterov, resp. fosfatidov, pričom väčšina lipolytických pochodov vyžaduje pre svoj optimálny priebeh hormóny štítnej žľazy a glukokortikoidy (F e r n l e y , 1971; M a y e s , 1977) potom prerušenie tyroideo-ovariálnych vzťahov po pôrode možno čiastočne vysvetliť insuficientným vplyvom znížených jódtyronínov na lipolytické pochody z celkovým negatívnym dopadom na syntézu ovariálnych steroidov. Negatívna korelačná závislosť vzťahov ALP : T_4 v rozsahu takmer celého sledovania a tesnosť pozitívnej korelácie daného vzťahu až v 51. dni po obahnení do určitej miery uvedenú hypotézu objektívizuje a dáva podnet na jej precíznejšie rozpracovanie.

V závere vychádzajúc z literárnych poznatkov a našich súčasných i skôr publikovaných výsledkov usudzujeme, že interakčné vzťahy medzi hormónmi štítnej žľazy a ALP s ich výsledným vplyvom na metabolizmus lipidov majú významné postavenie v modulácii syntézy steroidov. K ich realizácii však pravdepodobne dochádza až po ukončení reparačných procesov hypotalamo-adenohypofyzárnej osi. Placentárna ALP, aj napriek jej pretrvávaniu v systémovom obehu, dynamiku ovariálnych steroidov pravdepodobne neovplyvňuje.

Literatúra

- BEKEOVÁ, E. - ELEČKO, J. - KRAJNÍČÁKOVÁ, M. - HENDRICHOVSKÝ, V. - MARAČEK, I.: Dynamika zmien koncentrácie cholesterolu tyroidných a ovariálnych hormónov krvného séra v postpartálnom období bahnic. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991, s. 673-684.
- BEKEOVÁ, E. - KRAJNÍČÁKOVÁ, M. - HENDRICHOVSKÝ, V. - MARAČEK, I.: Účinok opakovanej aplikácie karbetocínu (Depotocin, Spofa) v prvých dňoch po pôrode na koncentrácie tyroxínu, trijódtyronínu, 17 beta-estradiolu, progesterónu a koncepciu bahnic. *Veter. Med. (Praha)*, 37, s. 393-404.
- BENJAMINSEN, E.: Plasma thyroxine in the sow during pregnancy and lactation and during resumption of ovarian activity after weaning. *Acta veter. scand.*, 22, 1981, s. 1-13.
- BOOS, A. - WITTKOWSKI, G. - SCHWARZ, R.: Activity of alkaline phosphatase in uterine flushings of dairy cows affected with ovarian cysts or endometritis. *Theriogenology*, 30, 1988, s. 217-225.
- BUGALIA, N. S. - SHARMA, R. D.: Endometrial glycogen, protein, nuclear acids and phosphatases during oestrus cycle in buffaloes (*Bubalus bubalus*). *Brit. veter. J.*, 146, 1990, s. 559-562.
- COLEMAN, R. A. - HAYNES, E. B.: Microsomal and lysosomal enzymes of triacylglycerol metabolism in rat placenta. *Biochem. J.*, 217, 1984, s. 391-397.
- FISHMAN, W. H. - BARDAVIL, M. D. - HABIB, H. G. - ANTISS, C. - GREEN, S.: The placental isoenzyme of alkaline phosphatase in serial of normal pregnancy. *Amer. J. clin. Pathol.*, 57, 1972, s. 57-65.
- FERNLEY, H. N.: Mammalian alkaline phosphatase. In: BOYER, P. D. (ed.): *The Enzymes*. 3rd ed. New York, Academic Press 1971, s. 417-447.
- FUKUDA, H. - OHSIMA, K. - MORI, M. - KOBAYASHI, I. - GREER, M. A.: Segmental changes in the pituitary-thyroid axis during pregnancy and lactation in the rat. *Endocrinology*, 107, 1980, s. 1711-1716.

- GRUMMER, R. R. - CARROLL, D. J.: A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *J. anim. Sci.*, 66, 1988, s. 3160-3173.
- KADLEC, O.: Stanovenie katalytickej aktivity enzýmov. In: DZÚRIK, R.: Štandardná kliniko-biochemická diagnostika. Martin, Osveta 1990, s. 135-160.
- KESLER, D. J. - JOHNSON, H. D. - GARVERICK, H. A.: Postpartum concentrations of thyroxine in plasma dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 64, 1981, s. 1618-1620.
- KNOPP, R. H. - WARTH, M. R. - CHARLES, D. - CHILDS, M. - LI, J. R. - MABUCHI, H. - VAN ALEN, M. I.: Lipoprotein metabolism in pregnancy fat transport to the fetus, and the effects of diabetes. *Biol. Neonate*, 50, 1986, s. 297-317.
- LARSON, L. L. - MARION, G. B. - GIER, H. T.: Glycogen metabolism in bovine endometrium. *Amer. J. veter. Res.*, 31, 1970, s. 1929-1935.
- MAYES, P.: Metabolismus lipidů. In: HARPER, H. A.: Přehled fyziologické chemie, Praha, Avicenum 1977, s. 309-346.
- NETT, T. M.: Function of the hypothalamic-hypophyseal axis during the post-partum period in ewes and cows. *J. Reprod. Fertil.*, 34, 1987, s. 201-213.
- OYA, M.: Rechtsmedizinischer Nutzen der alkalischen Placenta-Phosphatase bei Kindestotung. *Z. Rechtsmed.*, 94, 1985, s. 251-256.
- RIIS, P. M. - MADSEN, A.: Thyroxine concentrations and secretion rates in relation to pregnancy lactation and energy balance in goats. *J. Endocrinol.*, 107, 1985, s. 421-427.
- SCHIRAR, A. - COGNIE, Y. - LOUAULT, F. - POULIN, N. - MEUSNIER, C. - LEVASSEUR, M. C. - MARTINET, J.: Resumption of gonadotrophin release during the post-partum period in suckling and non-suckling ewes. *J. Reprod. Fertil.*, 86, 1990, s. 593-604.
- SUMIKAWA, K. - SAEKI, K. - OKOCH, T. - ACHI, K. - NISHIMURA, H.: Hydrolysis of phosphatidate by human placental alkaline phosphatase. *Clin. chim. Acta*, 167, 1987, s. 321-328.
- WALLACE, J. M. - ROBINSON, J. J. - AITKEN, R. P.: Does inadequate luteal function limit the establishment of pregnancy in the early post-partum ewe? *J. Reprod. Fertil.*, 85, 1989, s. 229-240.
- WITKOWSKI, G. - BOOS, A. - EHLERS, J. - ROMING, L. G. P.: Alkaline phosphatase activities and progesterone concentrations in uterine flushings of dairy cows: Side-effects and variations during oestrus cycle. *J. veter. Med.*, 36, 1989, s. 241-246.

Došlo 23. 11. 1992

BEKEOVÁ, E. - KRAJNÍČKOVÁ, M. - HENDRICHOVSKÝ, V. - MARÁČEK, I. (Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice):

Alkaline phosphatase in the puerperium of ewes and its relation to thyroid hormones and ovarian steroids.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (6) : 359-368.

Triacylglycerols as the sources of cholesterol, the primary precursor of steroid synthesis, are one of the factors that limit the speed of steroidogenesis. Synthesis and re-synthesis of triacylglycerols depend, in addition to other factors, on phosphatid hydrolysis that is controlled during pregnancy by placental ALP (Sumikawa et al., 1987) and the FFA pool in the systemic blood stream. Enzymes participating in FFA release from the fat tissue are affected by thyroid hormones and TSH (Mayes, 1977). In view of the above facts, this work was aimed at the observation of changes in alkaline phosphatase (ALP), thyroxine (T_4), triiodothyronine (T_3), 17β -oestradiol (E_2) and progesterone (P_4) levels and their mutual correlations in the systemic blood stream of sheep from the first day after parturition to day 51 p.p. Our attention was paid to the possible

delayed effects of placental ALP and thyroid hormones on the synthesis of ovarian steroids in puerperal ewes. Nine merino sheep were included in the experiment; they lambed in the first decade of February and were kept together with their lambs in a classical sheep-cot on deep litter. The animals were fed according to the Czechoslovak State Standard CSN 46 7070. Blood samples were taken from the *v. jugularis* from 8 to 9 o'clock a.m.: 24 hs (day -1) prior to parturition (a.p.), 36 hs and on days 4, 7, 14, 17, 21, 25, 34, 42 and 51 after parturition (p.p.). As compared with day -1 ($2.6 \pm 1.08 \mu\text{kat/l}$), ALP concentrations showed a decrease with minimum values occurring on day 17 ($1.34 \pm 0.97 \mu\text{kat/l}$, $P < 0.05$). T_4 concentrations also decreased from day -1 ($59.4 \pm 9.69 \text{ nmol/l}$) to day 21 ($54.89 \pm 11.06 \text{ nmol/l}$, $P < 0.05$). A similar decrease (from $1.82 \pm 0.33 \text{ nmol/l}$ on day 1 to $0.85 \pm 0.32 \text{ nmol/l}$ on day 21) could also be observed in T_3 levels. As early as 36 hs p.p., the concentrations of both steroid hormones, E_2 and P_4 , significantly decreased [from 2.45 ± 0.65 and $9.46 \pm 0.34 \text{ nmol/l}$ on day -1 to 0.30 ± 0.24 and $0.05 \pm 0.08 \text{ nmol/l}$, respectively ($P < 0.001$)]. Throughout the period of investigation, apart from an unsubstantial increase in E_2 values on days 17 and 42 and an episodic increase in P_4 levels on day 34, the concentrations of both steroids had the values that were significantly lower than those observed on day -1. Slightly, in comparison with day -1, insignificantly increased ALP concentrations were observed from day 17 to day 21; insignificantly increased T_4 and T_3 levels were recorded from day 21 to day 51.

In T_4 : ALP, a statistically significant correlation ($P < 0.001$) was observed as late as on day 51 p.p. while in ALP: P_4 and ALP: E_2 , a statistically significant correlation ($P < 0.05$) was recorded on days 17 and 42 p.p., respectively. The decrease in ALP levels observed until day 17 p.p. coincides with the data reported by Kadlec (1990), who says that the decrease in ALP concentrations is related to the extinction of the foetoplacental unit. A gradual increase in ALP levels could be induced by the gradual restoration of the hypothalamo-pituitary ovarian axis and the activation of ovarian steroid synthesis (Boos et al., 1988; Witkowski et al., 1989).

On the basis of literary data and our present as well as previous results it can be concluded that placental ALP does not probably affect the dynamics of ovarian steroids in spite of the fact that it persists in the systemic blood stream during early puerperium. The significance of correlation of the relation ALP: P_4 on day 51 *post partum* ($P < 0.001$) points to the mutual interconnection between thyroxine and ALP in this phase of reproductive cycle which can exert eventually a significant influence on metabolism of lipids and subsequently also on ovarian steroids.

ewe; puerpery; alkaline phosphatase; thyroxine; triiodothyronine; 17 beta-oestradiol; progesterone

Contact Address:

MVDr. Eva Bekeová, CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny,
Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 37429, fax 095 31853

ANTIHELMINTICKÉ OVPLYVNENIE POLYREZISTENTNÝCH NEMATÓDOV GASTROINTESTINÁLNEHO TRAKTU U IMPORTOVANÝCH KÔZ *)

J. Čorba, M. Várady, J. Praslička, Ľ. Veselý

Helmintologický ústav SAV, Košice

V stáde kôz kašmírského a angorského plemena importovaného z Nového Zelandu bol zistený výskyt polyrezistentných kmeňov gastrointestinálnych nematódov rodov *Ostertagia* a *Trichostrongylus*. Hodnoty ED₅₀ zistené *in vitro* EHA testom boli v rozmedzí od 0,27 do 0,36 µg/ml (pričom referenčná hodnota citlivosti je 0,10 µg/ml TBZ). Rezistencia voči všetkým typom v súčasnosti používaných antihelmintík bola potvrdená *in vivo* FECR testom, keď účinnosť doporučených dávok antihelmintík bola nižšia ako 90 % (albendazol 74 %, levamizol 86 %, ivermektín 83 %). Na dehelmintizáciu boli vyskúšané dve schémy terapie. Z nich bola účinná simultánna aplikácia antihelmintík v dvojnásobku až trojnásobku doporučených dávok (0,4 mg/kg ivermektín s.c., 30 mg/kg levamizol a 20 mg/kg albendazol p.o.). Pri vyšetrení zvierat 7 a 8 mesiacov po liečbe však bola opätovne zistená prítomnosť rezistentných kmeňov gastrointestinálnych nematódov. Ide o prvý vo svetovom meradle popísaný prípad medzikontinentálneho prenosu rezistentných kmeňov helmintov importom malých prežúvavcov.

koza; polyrezistencia; Egg Hatch Assay (EHA); Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT); antihelmintiká; *Ostertagia*; *Trichostrongylus*

Problematika vzniku rezistencie voči chemoterapeutikám je u baktérií, vírusov, plesní aj artropódov známa už dlhú dobu. V poslednom období sa prejavuje aj u helmintov, najmä gastrointestinálnych nematódov malých prežúvavcov (ovce, kozy), i keď rezistencia voči antihelmintikám bola zistená aj u helmintov koní, hovädzieho dobytku a ošípaných a v poslednom období aj u niektorých exotických zvierat (soby, pstruhy), ktoré sa chovajú farmárskym spôsobom. Rezistencia voči antihelmintikám najskôr vzniká tam, kde sa aplikujú pravidelne počas celého roka, pričom sa nedodržiava ich správne dávkovanie a obmena za prípravky s rozdielnym mechanizmom účinku. Rezistencia je najrozšírenejšia v Austrálii a Novom Zelande, krajinách s vyspelým chovom oviec a kôz, na ktorom závisí v značnej miere ekonomika týchto krajín.

MATERIÁL A METÓDY

Stádo 650 kôz kašmírského a angorského plemena bolo importované na Slovensko z Nového Zelandu v októbri 1991. Zvieratá boli rozmiestnené na štyri farmy

*) Výsledky boli získané pri riešení vnútorného grantu SAV 163/1992.

a boli držané v karanténe. Počas tejto sme zvieratá vyšetrili helmintoovoskopicke modifikovanou Mc Masterovou metódou (minimálna zachytanosť 10 vajíčok helmintov v 1 g féces). Vzorky féces boli odobraté metódou podľa autorov H u n t a T a y l o r (1989) a vyšetrené *in vitro* metódou EHA (Egg Hatch Assay - Le J a m b r e , 1976). Ide o test liahnutia lariev nematódov v rôznych koncentráciách čistej substancie tiabendazolu (TBZ) rozpustenom v dimetylsulfoxide. Hodnoty ED₅₀ sa vypočítavajú probitovou transformáciou a regresnou analýzou (F i n n e y , 1971). Za hraničnú hodnotu citlivosti sa považuje koncentrácia TBZ 0,1 µg/ml, v ktorej sa larvy nematódov z vajíčok ešte vyliahnú.

Výsledky *in vitro* testov sme overovali *in vivo* FECR testom (Faecal Egg Count Reduction Test - L y n d a l a M u r p h y , 1992). Tento test redukcie počtov vajíčok vo féces stanovuje účinnosť antihelmintika porovnaním počtov vajíčok vo féces pred a 7 - 10 dní po dehelmintizácii doporučenou dávkou prípravku. Vypočítava sa aritmetický priemer a percento redukcie pri 95% koeficiente spoľahlivosti.

Laboratórnu kultiváciu vajíčok na larvy tretieho štádia (L₃) pre určenie rodovej príslušnosti prítomných nematódov sme robili metódou odporúčanou M A F F (1986).

Všetky použité metódy sú v súlade s doporučeniami W.A.A.V.P. (Svetová asociácia pre pokrok vo veterinárnej parazitológii) pre detekciu antihelmintickej rezistencie u nematódov (C o l e s a i . , 1992).

V experimentoch sme použili nasledujúce antihelmintiká:

albendazol (ABZ) - Aldifal susp., výrobca MEVAK a.s. Nitra

levamizol (LEV) - Revlin susp., výrobca MEVAK a.s. Nitra

ivermektín (IVM) - Ivomec inj., výrobca MSD, USA

albendazol (ABZ) vo forme intraruminálneho bólu - Proftril - Captec, výrobca SKF, USA

tiabendazol (TBZ) - čistá substancia, výrobca MSD, USA

VÝSLEDKY

Hodnoty ED₅₀ zistené *in vitro* testom liahnutia lariev (EHA) boli na štyroch vyšetrených farmách na začiatku experimentov medzi 0,27 až 0,36 µg/ml TBZ, čo potvrdzovalo výskyt benzimidazol - rezistentných nematódov (tab. I). Na farme č. 4 sme overili účinnosť u nás používaných antihelmintík v dávkach odporúčaných pre ovce. V každej skupine sme mali po 20 zvierat, ktorým sme aplikovali jednorázove: I. skupina 5 mg/kg ABZ *p.o.*; II. skupina 7,5 mg/kg LEV *p.o.*; III. skupina 0,2 mg/kg IVM *s.c.*.

10 dní po liečbe sme *in vivo* testom redukcie počtov vajíčok vo féces zistili túto priemernú účinnosť: ABZ 74 %, LEV 86 %, IVM 83 %. Tieto hodnoty potvrdzovali výskyt polyrezistencie voči použitým antihelmintikám. Preto sme sa rozhodli pre kombinovanú terapiu za použitia uvedených antihelmintík, lebo sme predpokladali ich synergický účinok. Každému zvieraťu vo všetkých štyroch stádach kôz sme na 1. deň pokusu aplikovali po 0,2 mg/kg IVM *s.c.* a o 10 dní po 5 mg/kg ABZ a 15 mg/kg LEV, oba prípravky perorálne. Na troch farmách, kde boli umiestnené len kozy kašmírskeho plemena, sme ovoskopicke vyšetrením modifikovanou

I. Hodnoty ED₅₀ na začiatku experimentov – ED₅₀ values at the beginning of the experiments

Farma ¹	ED ₅₀ v µg/ml TBZ
1	0,27
2	0,27
3	0,28
4	0,36

¹farm

II. Účinnosť antihelmintík na rezistentné gastrointestinálne nematódy u angorských kôz – The efficacy of anthelmintics in the control of resistant gastrointestinal nematodes in angora goats

Skupina ¹	Prípravok ²	Priemerný EPG ± SD ³		Účinnosť ⁴ (%)
		pred terapiou ⁵	po terapii ⁶	
I	ABZ susp. p.o.	58 ± 38	24 ± 14	56
II	ABZ bolus p.o.	105 ± 28	49 ± 49	55
III	LEV susp. p.o.	35 ± 13	53 ± 56	0
IV	IVM inj. s.c.	26 ± 22	13 ± 12	50

¹group, ²preparation, ³average EPG ± SD, ⁴efficacy, ⁵before treatment, ⁶after treatment

Vysvetlivky pre tab. I a II – Explanatory notes to Tabs. I and II:

ABZ = albendazol – albendazole

LEV = levamizol – levamisole

IVM = ivermektín – ivermectin

TBZ = tiabendazol – thiabendazole

EPG = počet vajíčiek v 1 g – egg number per 1 g

Mc Masterovou metódou na 8. a 25. deň po terapii nenašli vo vzorkách feces žiadne vajíčka helmintov.

Na farme č. 4, kde bolo chovaných spolu 78 kašmírskych a 28 angorských kôz, sme negatívne výsledky zistili len u kašmírskych kôz. U angorských kôz boli použité antihelmintiká v uvedenej schéme aplikácie neúčinné, keď počty vajíčok v 1 g feces (eggs per gram, EPG) dosahovali hodnoty až 437, pričom z 28 liečených bolo 24 zvierat pozitívnych. Vyšetrením feces EHA metódou sme zistili, že ED₅₀ teraz dosahovala hodnotu 1,13 µg/ml TBZ, čo predstavovalo štvornásobné zvýšenie hodnôt rezistencie v porovnaní s hodnotami u pôvodných izolátov nemátodov. Laboratórnou kultiváciou feces sme u lariev L₃ zistili, že rezistentný izolát nemátodov pozostával z 54 % *Ostertagia* spp. a 46 % *Trichostrongylus* spp.

Pre zistenie stupňa citlivosti tohto izolátu nemátodov sme 24 pozitívnych kôz angorského plemena rozdelili do 4 skupín po 6 zvierat. Zvieratám v I. skupine sme aplikovali po 5 mg/kg ABZ p.o., v II. skupine každé zviera dostalo po jednom intra-ruminálnom bôluse obsahujúcom ABZ, III. skupine sme aplikovali po 7,5 mg/kg

LEV p.o. a štvrtej skupine po 0,2 mg/kg IVM s.c. Výsledky tohto pokusu sú uvedené v tab. II. Vzhľadom na nedostatočnú účinnosť skúšaných antihelmintík v použitých dávkach sme sa rozhodli, po konzultácii s novozelandským odborníkom (Mc Kenna, 1991), použiť dvoj- až trojnásobky doporučených dávok a antihelmintiká aplikovať súčasne. Takto každej z 24 angorských kôz sme podali po 0,4 mg/kg IVM s.c. a perorálne po 30 mg/kg LEV a 20 mg/kg ABZ.

Individuálnym helmintoovoskopickým vyšetrením féces na 8. a 21. deň po liečbe sme nenašli žiadne vajíčka gastrointestinálnych nematódov. Na základe tohto výsledku sme doporučili ukončenie karantény s podmienkou, že všetky sledované zvieratá sa budú pásť oddelene na pasienku kde sa v predchádzajúcom roku nepásli ovce ani kozy.

Všetky chovy kašmírskych a angorských kôz sme ovoskopicky vyšetrovali na prítomnosť zárodkov helmintov počas celej pastevnej sezóny. Pri vyšetrení na 7. a 8. mesiac od uvoľnenia karantény (september a október 1992) sme vo dvoch chovoch zistili metódou EHA hodnoty ED₅₀ 0,112 a 0,150 µg/ml, ktoré potvrdzujú opätovný výskyt rezistentných kmeňov nematódov. V treťom vyšetrovanom chove sme zistili hodnotu ED₅₀ 0,088 µg/ml, čo je hodnota blízka referenčnej hladine citlivosti. V jednom chove kôz sa pre nízke počty vajíčok vo féces test nedal hodnotiť.

DISKUSIA

Z našich výsledkov vyplýva, že importom invadovaných kôz z Nového Zelandu sme introdukovali na územie SR polyrezistentné kmene gastrointestinálnych nematódov rodov *Ostertagia* a *Trichostrongylus*. V odbornej literatúre doteraz neboli popísaný obdobný prípad medzikontinentálneho prenosu rezistentných kmeňov gastrointestinálnych nematódov malých prežúvavcov.

O tom, že už v spomínaných krajinách je problém nematodorezistencie voči antihelmintikám u oviec a kôz vážnym problémom, svedčia mnohé publikované správy. U kôz bol tento fenomén popísaný najmä na Novom Zelande (Kettle a i., 1983; Scherrer a i., 1989; Badger a McKenna, 1989; McKenna, 1991), v Austrálii (Barton a i., 1985), v USA (Craig a Miller, 1990), vo Veľkej Británii (Scott a i., 1989; Jackson a i. (1992), v Belgicku (Vereruyse a i., 1989; Geerts a i., 1990), vo Francúzsku (Kerboeuf a Hubert, 1985) ako aj v Indii (Yadava Uppal, 1992 a Srí Lanke (Aken a i., 1989). Hlavné príčiny vzniku rezistencie u nematódov a spôsoby jej prevencie sme popísali nedávno (Veselý a i., 1992).

Z našich výsledkov je zrejmé, že dávky antihelmintík odporúčané pre ovce sa u kôz musia minimálne zdvojnásobiť, lebo farmakokinetika a biologická dostupnosť antihelmintík u oviec a kôz je rozdielna (Delatour, 1984). K podobnému záveru došli aj Geerts a i., (1990). Ďalej je zrejmé, že napriek použitiu vysokých dávok antihelmintík, ich simultánnej aplikácii a synergistickému efektu ich účinkov na rezistentné gastrointestinálne nematódy bol len dočasný a po určitom období sa obnovila produkcia vajíčok samičkami nematódov. Použitie kombinácie antihelmintík s rozdielnym mechanizmom účinku doporučujú niektorí autori (McKenna, 1990; Pomroy a i., 1992). Títo autori však nesledovali dlhodobý účinok použitých antihelmintík. Z našich pozorovaní vyplýva, že importované kozy,

ktoré sa pásli na izolovaných pasienkoch, nemohli byť reinvadované rezistentnými kmeňmi nematódov v našich chovateľských podmienkach. Dôležitý je aj poznatok o genetickej selekcii rezistentných nematódov, keď sa hladiny rezistencie voči antihelmintikám u angorských kôz v krátkom časovom rozpätí zvýšili štvornásobne.

Z výsledkov nášho skúmania vyplýva, že s výskytom rezistencie helmintov k antihelmintikám treba počítať aj v našich chovateľských podmienkach, najmä pri zmene štruktúry a vlastníckych vzťahov v poľnohospodárstve. Je nanajvýš nutné, aby importované zvieratá pochádzajúce najmä zo spomínaných krajín, boli počas karantény vyšetrené pracovníkmi Referenčného centra ŠVS SR, ktoré pôsobí pri Helmintologickom ústave SAV a ktoré je schopné pokryť aj potreby ČR.

Taktiež je nevyhnutné vypracovať účinné legislatívne opatrenia na ochranu území štátov pred zavlečením rezistentných kmeňov helmintov importovanými zvieratmi. Kým v prípade infekčných ochorení jestvujú prísne medzinárodné predpisy, pre parazitárne ochorenia doteraz takého predpisu nie sú zavedené.

Literatúra

- AKEN, D. Van - BONT, J. D. - VERCRUYSE, J.: Benzimidazole resistance in a field population of *Haemonchus contortus* from goats in Sri Lanka. Small Ruminant Res., 2, 1989, s. 281-287.
- BADGER, S. B. - Mc KENNA, P. B.: Resistance to ivermectin in a field strain of *Ostertagia* spp. in goats. N. Z. veter. J., 38, 1990, s. 72-74.
- BARTON, N. J. - TRAINOR, B. L. - URIE, I. S. - ATKINS, J. W. - PYMAN, M. F. S. - WOLSTENCROFT, I. R.: Anthelmintic resistance in nematode parasites of goats. Austral. veter. J., 62, 1985, s. 224-227.
- COLES, G. C. - BAUER, C. - BORGSTEEDE, F. H. M. - GEERTS, S. - KLEI, T. R. - TAYLOR, M. A. - WALLER, P. J.: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Veter. Parasitol., 44, 1992, s. 35-44.
- CRAIG, T. M. - MILLER, D. K.: Resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in angora goats. Veter. Rec., 126, 1990, s. 580.
- DELATOUR, P.: Pharmacocinetique comparée de l'exfendazole chez la chevre et le monton. In: Les maladies de la chevre. Niort (France), INRA 1984, s. 513-516.
- FINNEY, D. J.: Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge University Press 1971, s. 333.
- GEERTS, S. - BERTELS, G. - BALIS, B. - BRANDT, J. - KUMAR, V.: Benzimidazole resistance in nematodes on a dairy goat farm in Belgium. Vlaams diergeneesk. Tijdschr., 59, 1990, s. 90-92.
- HUNT, K. R. - TAYLOR, M. A.: Use of egg hatch assay on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole resistant worms. Veter. Rec., 125, 1989 s. 153-154.
- JACKSON, F. - COOP, R. L. - JACKSON, E. - SCOTT, E. W. - RUSSEL, A. J. F.: Multiple anthelmintic resistant nematodes in goats. Veter. Rec., 128, 1992, s. 41-42.
- MC KENNA, P. B.: Multigenetic resistance to benzimidazole anthelmintics in sheep. N. Z. veter. J., 37, 1989, s. 62-64.
- MC KENNA, P. B.: The use of benzimidazole - levamisole mixtures for the control and prevention of anthelmintic resistance in sheep nematodes: an assessment of their likely effects. N. Z. veter. J., 40, 1991, s. 45-49.
- KERBOEUF, D. - HUBER, J.: Benzimidazole resistance in field strains of nematodes from goats in France. Veter. Rec., 116, 1985, s. 133-134.
- KETTLE, P. R. - VLASSOFF, A. - REID, T. C. - HORTON, C. T.: A survey of nematode control measures used by milking goat farmers and of anthelmintic resistance on their farms. N. Z. veter. J., 31, 1983, s. 139-143.

- LE JAMBRE, L. F.: Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Veter. Parasitol.*, 2, 1976, s. 385-391.
- LYNDAL - MURPHY, M.: Diagnosis of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep. *Austral. Stand. Diagn. Techn. for Anim. Diseases*, 46, 1992, s. 158-169.
- POMROY, W. E. - WHELAN, N. - ALEXANDER, A. M. - WEST, D. W. - STAFFORD, K. - ADLINGTON, B. A. - CALDER, S. M.: Multiple resistance in goat-derived *Ostertagia* and the efficacy of moxidectin and combinations of other anthelmintics. *N. Z. veter. J.*, 41, 1992, s. 76-78.
- SCOTT, E. W. - BAIRDEN, K. - HOLMES, P. H. - Mc KELLAR, Q. A.: Benzimidazole resistance in nematodes of goats. *Veter. Rec.*, 124, 1989, s. 492-493.
- SCHERRER, A. M. - POMROY, W. E. - CHARLESTON, W. A. G.: A survey of antihelmintic resistance on ten goat farms in the Manawatu region in 1988. *N. Z. veter. J.*, 37, 1989, s. 148-149.
- VERCRUYSE, J. - DORNY, P. - MEURRENS, K.: Benzimidazole resistance of nematodes in sheep in Belgium. *Veter. Rec.*, 125, 1989, s. 602-603.
- VESELÝ, L. - PRASLIČKA, J. - VÁRADY, M. - ČORBA, J.: Rezistencia nematódov voči antihelmintikám. *Veterinářství*, 42, 1992, s. 54-55.
- YADAV, C. L. - UPPAL, R. P. - GODARA, P. - RANA, Z. S.: Multiple anthelmintic resistance in a field strain of *Haemonchus contortus* in goats. *Veter. Res. Commun.*, 16, 1992, s. 195-198.
- MAFF: Manual of veterinary parasitological laboratory techniques, 13, 1986, 159 s.

Došlo 26. 10. 1992

ČORBA, J. - VÁRADY, M. - PRASLIČKA, J. - VESELÝ, L. (Helminthological Institute of the Slovak Academy of Sciences, Košice):

Anthelmintic control of multiple resistant gastrointestinal nematodes in imported goats.
Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (6) : 369-374.

Multiple resistant strains of *Ostertagia* and *Trichostrongylus* were detected in a flock of cashmere and angora goats imported from New Zealand. The ED₅₀ values detected by *in vitro* EHA test were from 0.27 to 0.36 µg/ml (while the reference value of sensitivity is 0.10 µg/ml TBZ). Multiple resistance to all the types of currently used anthelmintics was confirmed by *in vivo* FECRT, when the efficacy of recommended doses was lower than 90 % (albendazole 74 %, levamisole 86 %, ivermectin 83 %). Two control schemes were investigated.

In the simultaneous application of anthelmintics in the double or triple of recommended doses (0.4 mg/kg ivermectin *s.c.*, 30 mg/kg levamisole and 20 mg/kg albendazole *p.o.*) was effective. Examination of goats 7 and 8 months after treatment revealed the repeated presence of multiple resistant gastrointestinal nematodes. It is the first published case of intercontinental transfer of resistant strains of nematodes when importing small ruminants.

multiple resistance; Egg Hatch Assay (EHA); Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT); anthelmintics; *Ostertagia*; *Trichostrongylus*

Contact Address:

MVDr. Július Č o r b a, DrSc., Helminthologický ústav SAV, Hlinkova ul. 3,
 040 01 Košice, Slovak Republic
 Tel. 095 34455

VIROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ KORMORÁNŮ VELKÝCH NA ARBOVIRY

Z. Juřicová¹, Z. Hubálek¹, J. Halouzka¹, P. Macháček²

¹Ústav systematické a ekologické biologie AV ČR, Brno

²Regionální muzeum, Mikulov

Krev 56 kormoránů velkých (*Phalacrocorax carbo*, *Pelecaniformes*) odchycených na jižní Moravě (Česká republika) v letech 1989-1990, byla vyšetřena na infekci způsobenou arboviry inokulací sajících myšek. Výsledky izolačních experimentů byly negativní. Sérologicky bylo vyšetřeno 31 kormoránů v hemaglutinačně inhibičním testu (HIT) za použití 5 arbovirových antigenů rodů *Alphavirus* (Sindbis - SIN), *Flavivirus* (klíšové encefalitidy - TBE, West-Nile - WN) a čeledi *Bunyviridae* (Tahyňa - TAH, Čalovo - CVO). Protilátky byly detegovány pouze proti virům SIN, WN a TAH v různé frekvenci: 9,7 %; 9,7 %; 22,6 %. Výška titrů se pohybovala od 1 : 20 do 1 : 80.

ptáci; arboviry; hemaglutinačně inhibiční protilátky; jižní Morava

Ptáci mají pro některé arboviry význam jako rezervoár infekce v přírodním ohnisku nebo při transkontinentálním přenosu infekce v období sezónních migrací.

Také ve střední Evropě bylo prokázáno, že ptáci mohou sloužit jako hostitelé arbovirů (Ernek aj., 1971, 1975; Grešíková aj., 1975). Protilátky proti některým arbovirům byly zjištěny i na jižní Moravě, ale kormoráni v této oblasti vyšetření nebyli. Proto bylo cílem naší práce vyšetřit sérologickými a virologickými metodami spojitost mezi volně žijícími kormorány a arboviry.

MATERIÁL A METODY

Během let 1989 a 1990 bylo odchyceno 56 kormoránů velkých. Odběr vzorků byl prováděn po dohodě se Správou CHKO a BR Pálava a ve spolupráci se Státním rybářstvím Pohořelice.

Čtyři dospělí jedinci byli v září 1989 zastřeleni na rybníku Hlohovecký a 52 mláďat bylo v květnu 1990 vybráno z hnízd na spodní zdrži vodního díla Nové Mlýny u Dolních Věstonic. Krev na izolační a sérologické vyšetření byla odebrána punkcí ze srdce. Většina ptáků byla ve věku do 4 týdnů, někteří 5 - 6 týdnů, hmotnost se pohybovala od 90 do 1 700 g.

IZOLAČNÍ VYŠETŘENÍ

Krev byla ředěna 1 : 1 v chlazeném MEM s 10 % telecího séra a antibiotiky (penicilin 200 j/ml a streptomycin 100 µg/ml) a heparinem (5 j/ml). Vzorky byly uloženy při -60 °C až do provedení intracerebrální a subkutánní inokulace (0,02 ml)

SPF myším ve věku 1 - 3 dny (Velaz Praha). Některé vzorky byly vyšetřeny paralelně na buňkách VERO. Inokulovaná zvířata byla pozorována po dobu 21 dní. Bakteriální sterilita byla testována v bujónovém a thioglykolátovém médiu (Imuna, Šarišské Michalany).

HEMAGLUTINAČNĚ INHIBIČNÍ TEST

Krevní sérum bylo extrahováno acetonem, vysyceno houseřím erytrocyty a testováno v HIT podle autorů C l a r k e a C a s a l s (1958), modifikovaném pro Takatsyho mikrotitrátor (T a k a t s y , 1958). Antigen TBE je komerční (Imuna, Šarišské Michalany). Ostatní antigeny byly připraveny sacharózo-acetonovou extrakcí mozků infikovaných sajících myší podle autorů C l a r k e a C a s a l s (1958). V testu byly použity čtyři jednotky hemagglutininu. Za pozitivní byly považovány titry 1 : 20 a vyšší.

VÝSLEDKY

Výsledky izolačních pokusů u 56 kormoránů byly negativní. Vzorky krve 31 kormoránů byly testovány v HIT proti arbovirům přenášeným komáry (SIN, WN, TAH, CVO) a klíšťaty (TBE). U kormoránů byly detekovány protilátky proti virům SIN, WN a TAH. Výška titrů se pohybovala v rozmezí 1 : 20 až 1 : 80. Výsledky jsou shrnuty v tab. I.

Nejvyšší promořenost byla zjištěna u viru TAH (22,6 %). Frekvence pozitivních nálezů u virů WN a SIN byla nižší (9,7 %). Protilátky proti viru CVO a TBE nebyly zjištěny.

V tab. II je uvedena hmotnost a odhad věku kormoránů, u nichž byly zjištěny protilátky.

DISKUSE

Nález protilátek proti arbovirům SIN, WN a TAH u ptáků na jižní Moravě je v souladu s dřívějšími výsledky (E r n e k aj. 1971, 1973/74, 1975, 1977; K o l m a n aj., 1976; J u ř i c o v á aj., 1987a,b; H u b á l e k aj., 1989).

Podle Fauny ČSSR (H u d e c a Č e r n ý , 1972) je průměrná hmotnost samců 2 528 g a samic 2 025 g, u nás hnízdící kormoráni mají hmotnost od 1 600 g do 3 100 g. Mláďata dosahují vzletnosti a přibližně i hmotnosti dospělých ve věku dvou měsíců. Většina námi vyšetřených ptáků tedy nebyla starší jak čtyři týdny. U těchto pozitivních mláďat nelze vyloučit, že se jedná o detekci mateřských protilátek. Z literárních pramenů je známo, že mateřské protilátky arbovirů mohou u ptačích mláďat persistovat až 4 týdny (H o l d e n , 1973). Zajímavý je ale nález protilátek u jedinců vyššího věku (5 - 6 týdnů). V tomto případě by pozitivita mohla dokazovat, že ptáci mohli přijít do kontaktu s infekcí přímo ve zkoumané lokalitě. Z toho by se dalo usuzovat, že viry WN (vzorek č. 2001) a TAH (vzorek č. 1991, popř. č. 1993) na daném území v různé míře cirkulují.

I. Přehled protilátek proti arbovirům u volně žijících kormoránů (*P. carbo*) v HIT) – An overview of antibodies to arboviruses in wildy living cormorants (*P. carbo*) detected by HIT

Antigen ¹	SIN	WN	TBE	TAH	CVO
Počet pozitivních ²	3	3	0	7	0
Počet vyšetřených ³	31	31	31	31	31
% pozitivních ⁴	9,7	9,7	0	22,6	0

¹ antigen, ² number of positive findings, ³ number of examined samples, ⁴ % of positive findings

II. Hmotnost a věk pozitivních vzorků krve kormoránů velkých (*P. carbo*) – The weight and age of cormorants (*P. carbo*) with positive findings

Antigen ¹	Vzorek číslo ²	Hmotnost ³ (g)	Odhad věku (dny) ⁴
WN	2001	1450	35
	2002	1050	25
	2004	950	22
TAH	1988	850	20
	1991	1700	41
	1993	1350	32
	1998	1000	23
	2003	750	17
	2004	950	22
	2007	750	17
SIN	1983	770	18
	1985	700	16
	2009	500	11

¹ antigen, ² sample No., ³ weight, ⁴ age estimate (days)

U čtyř dospělých jedinců odchycených v září 1989 nebyly zjištěny protilátky proti žádnému z vyšetřovaných virů, což mohlo být způsobeno malým počtem vzorků získaných v tomto roce.

Protilátky proti viru CVO nebyly detekovány u žádného ptáka. To naznačuje, že kormoráni ve sledovaném období nepřicházeli do styku s virem CVO.

Absence protilátek proti klíšťatý přenášenému viru TBE ukázala, že se kormoráni nepodílí na ekologii tohoto viru. Při prohlídce tří hnízd nebyla nalezena žádná klíšťata.

Poděkování

Děkujeme paní Serbajlové a L. Ševčíkové za technickou asistenci.

Literatura

- CLARKE, D. H. - CASALS, J.: Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition test with arthropod-borne viruses. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 7, 1958, s. 561-573.
- ERNEK, E. - KOŽUCH, O. - SEKEYOVÁ, M. - HUDEC, K. - FOLK, Č.: Antibodies to arboviruses in birds in Czechoslovakia. *Acta virol.*, 15, 1971, s. 135.
- ERNEK, E. - KOŽUCH, O. - NOSEK, J. - LABUDA, M.: Evidence for circulation of Sindbis virus and other arboviruses by using sentinel animals in western Slovakia. *Intervirology*, 2, 1973/74, s. 186-192.
- ERNEK, E. - KOŽUCH, O. - NOSEK, J. - HUDEC, K. - FOLK, Č.: Virus neutralizing antibodies to arboviruses in birds of the order *Anseriformes* in Czechoslovakia. *Acta virol.*, 19, 1975, s. 340-353.
- ERNEK, E. - KOŽUCH, O. - NOSEK, J. - TEPLAN, J. - FOLK, Č.: Arboviruses in birds captured in Slovakia. *J. Hyg. Epidem.*, 21, 1977, s. 353-359.
- GREŠÍKOVÁ, M. - SEKEYOVÁ, M. - PRAZNAKOVÁ, E.: Isolation and identification of group B arboviruses from the blood of birds captured in Czechoslovakia. *Acta virol.*, 19, 1975, s. 162-164.
- HOLDEN, P. - FRANCY, D. B. - MITCHELL, C. J. - HAYES, R. O. - LAZUICK, J. S. - HUGHES, T. B.: House sparrows, *Passer domesticus* (L.), as hosts of arboviruses in Hale country, Texas, I-II. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 22, 1973, s. 244-262.
- HUBÁLEK, Z. - JUŘICOVÁ, Z. - HALOUZKA, J. - PELLANTOVÁ, J. - HUDEC, K.: Arboviruses associated with birds in southern Moravia, Czechoslovakia. *Acta Sc. Nat. Brno*, 23, 1989, s. 1-50.
- HUDEC, K. - ČERNÝ, W. (ed.): Fauna ČSSR - Práci - Aves. Díl I. Praha, Academia 1972, s. 206-214.
- JUŘICOVÁ, Z. - HALOUZKA, J. - HUBÁLEK, Z.: Serological examination of birds for arboviruses in south Moravia. *Biologia*, 42, 1987a, s. 1097-1101.
- JUŘICOVÁ, Z. - HALOUZKA, J. - HUBÁLEK, Z. - PELLANTOVÁ, J. - CHÝTIL, J.: Haemagglutination-inhibiting antibodies against arboviruses of the families *Togaviridae* and *Bunyaviridae* in birds caught in southern Moravia, Czechoslovakia. *Folia parasitol.*, 34, 1987b, s. 281-284.
- KOLMAN, J. M. - FOLK, Č. - HUDEC, K. - REDDY, G. N.: Serologic examination of birds from the area of southern Moravia for the presence of antibodies against arboviruses of the group Alfa, Flavo, Uukuniemi, Turlock and Bunyamwera supergroup. II. Wild living birds. *Folia parasitol.*, 23, 1976, s. 251-255.
- TAKATSY, G. Y.: The use of spiral loops in serological micromethods. *Acta Microb. Hung.*, 3, 1956, s. 191-202.

Došlo 26. 10 1992

JUŘICOVÁ, Z. - HUBÁLEK, Z. - HALOUZKA, J. - MACHÁČEK, P. (Institute of Systematical and Ecological Biology, Academy of Sciences, Brno; Regional Museum, Mikulov): **Virological examination of cormorants for arboviruses.**
Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (6) : 375-379.

Cormorants (*Phalacrocorax carbo*, *Pelecaniformes*) caught in southern Moravia (Czech Republic) in 1989 - 1990 were examined for arbovirus infections. Isolation experiments were carried out using blood samples of 56 birds. The results were negative.

Serological examinations of 31 birds were performed by haemagglutination-inhibition test (HIT) using 5 arboviral antigens of the genera Alphavirus (Sindbis - SIN) and Flavivirus (tick-borne encephalitis - TBE, West Nile - WN) and of the family Bunyaviridae (Tahyna - TAH, Čalovo - CVO). Antibodies were detected only to viruses SIN, WN and TAH at different frequencies: 9.7 %, 9.7 % and 22.6 %. The titres ranged from 1 : 20 to 1 : 80.

birds; arboviruses; haemagglutination-inhibition antibodies; South Moravia

Contact Address:

RNDr. Zina Juřicová, CSc., Ústav systematické a ekologické biologie AV ČR,
691 42 Valtice, Czech Republic
Tel. 0627 94387



**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**



PRVNÍ NÁLEZY *GIARDIA* SPP. U SRNCE OBECNÉHO (*CAPREOLUS CAPREOLUS* L.)

Střevního bičíkovce rodu *Giardia* našel v roce 1681 Antony van Leeuwenhoek. Přestože uplynulo již 312 let od prvního zjištění jeho existence, zůstává tento prvok i v současné době objektem zájmu parazitologů a specialistů v humánní i veterinární medicíně. Je tomu tak proto, že se doposud nepodařilo mimo jiné uspokojivě vyřešit např. otázku druhového spektra a specificity giardií. V souvislosti s touto skutečností a vzhledem k narůstání prevalence giardiózy u člověka, zejména u dětí a pacientů se syndromem získané imunodeficiency, jsou studie zabývající se hledáním zdrojů nákaz, cest šíření a možností přenosů tohoto protozoárního onemocnění mezi různými hostiteli v životním prostředí stále aktuálnější a potřebnější. Význam nutnosti dalších výzkumů v této oblasti podtrhují i úvahy některých autorů (Healy, 1990; Buret aj., 1990; Gasser, 1990), kteří nákazu vyvolanou bičíkovcem rodu *Giardia* řadí mezi zoonózy.

V souladu s touto velmi složitou a komplikovanou epidemiologickou a epizootologickou problematikou informujeme ve svém krátkém sdělení o vůbec prvních nálezech *Giardia* spp. u srnce obecného (*Capreolus capreolus*) ve třech různých oblastech České republiky.

Na pracoviště Státního veterinárního ústavu v Praze byly v období od ledna do března 1993 zaslány tři uhynulé kusy srnčí zvěře. Parazitologicky bylo vyšetřeno srnče (ve věku asi 7 - 8 měsíců) z jedné lokality jižní Moravy, srna a srnec ze dvou honiteb ve středních Čechách. Endoparazité v zažívacím traktu zvěře byli zjišťováni neúplnou helmintologickou pitvou. K průkazu trofozoitů *Giardia* spp. byl vyšetřován obsah zažítiny ředěné fyziologickým roztokem z duodena a potom v úsecích po 30 - 40 cm po celé délce tenkého střeva v nativních preparátech. Ze stejných úseků byly dále zhotoveny seškraby střevních epitelů, které po fixaci metanolem byly barveny metodou podle Giemsa. Metodou podle Brezy (1957) byl koprologicky vyšetřován trus pitvané zvěře odebraný ze slepého a tlustého střeva. Z lokality na jižní Moravě, ze které pocházelo srnče, bylo v březnu 1993 orientačně vyšetřeno stejnou metodou flotace 10 vzorků trusu dospělé zvěře; z honitby ze středních Čech, kde byl zaregistrován úhyn srnce, 14 vzorků trusu mladé (do dvou let) a 10 vzorků starší (více jak dva roky) srnčí zvěře. Z další lokality ve středních Čechách bylo koprologicky vyšetřeno 10 vzorků trusu.

U všech tří uhynulých pitvaných kusů srnčí zvěře byla prokázána nákaza *Giardia* spp. V nativních preparátech i v seškrabech střevní sliznice srnčete byli trofozoiti giardií nalezeni v tenkém střevě v úseku 280 cm od duodena až do vzdálenosti 770 cm. Nejvyšší intenzita jejich výskytu byla v úseku 350 - 420 cm. Většina trofozoitů volně plavala ve střevním obsahu, někteří byli přichyceni adhezivním diskem k enterocytům v odloupené sliznici střeva. I když srnče bylo pitváno více než 48 hodin po úhynu, bylo ještě v úseku jejich nejintenzivnějšího nálezu relativně

mnoho aktivně se pohybujících trofozoitů. Toto zjištění ukazuje na jejich poměrně značnou životaschopnost a je významné i pro účely diagnostické. Jen velmi ojediněle byli nalezeni trofozoiti i v obsahu slepého střeva. Lokalizace trofozoitů *Giardia* spp. u srny a srnce nemohla být z objektivních důvodů studována vzhledem k pokročilým autolytickým procesům střevního traktu. Ve slepém a tlustém střevě srnčete, srny a srnce byly zjištěny velmi početné cysty giardií.

V nativním preparátu zhotoveném z obsahu střeva ve vzdálenosti asi 420 cm od kaudální části duodena bylo proměřeno 30 trofozoitů *Giardia* spp. Trofozoiti měli hruškovitý tvar a jejich velikost byla 12,4 - 16,2 x 8,0 - 11,5 μ m (průměr 14,5 x 9,4 μ m).

Velikost cyst giardií byla zjišťována rovněž v nativních preparátech zhotovených ze vzorků trusu odebraných z tlustého střeva proměřením 50 cyst od každého uhynulého zvířete. Bylo možné rozlišit dvě formy cyst: oválný a kulovitý. Většina cyst měla oválný tvar a jejich velikost byla 11,2 - 14,4 x 8,0 - 10,4 μ m (průměr 13,3 x 9,1 μ m). Cysty téměř kulovitého tvaru se vyskytovaly velmi sporadicky a jejich velikost byla 12,8 - 13,6 x 9,6 - 10,4 μ m. Žádné výrazné rozdíly ve velikosti cyst *Giardia* spp. mezi jednotlivými kusy srnčí zvěře nebyly pozorovány.

Cysty *Giardia* spp. byly nalezeny v jednom z 10 vyšetřovaných vzorků trusu srnčí zvěře odebraných z honitby, v níž uhynulo srnče. Pozitivní nález cyst giardií byl prokázán rovněž ve dvou ze 14 vyšetřovaných vzorků trusu mladé a v jednom z 10 vzorků trusu starší srnčí zvěře z lokality, ve které došlo k úhynu srnce. Ve dvou z 10 vzorků trusu byly cysty bičíkovce nalezeny také u zvěře z další lokality ve středních Čechách.

Srnc obecný (*Capreolus capreolus*) je tedy novým hostitelem střevního bičíkovce rodu *Giardia*. Dosavadní výsledky našich sledování naznačují, že s největší pravděpodobností bude u srnčí zvěře tento prvok častým parazitem. I když jsme *Giardia* spp. prokázali u všech tří kusů uhynulých zvířat, bylo by příliš spekulativní a neobjektivní na základě těchto předběžných výsledků vyvozovat jakékoli definitivní závěry o významu vlivu giardií na zdravotní stav srnčí zvěře. U všech tří zvířat byla patologicko-anatomickou pitvou zjištěna vyhublost, otok a ložiskové překrvení plic a dilatace pravé komory srdeční. U srnčete byl zjištěn také lehký ložiskový subakutní katarální zánět sliznice středního úseku jejunu a ilea. U srny byly nalezeny petechiální krváceniny pod pouzdrem sleziny, sliznice trávicího traktu byla bez závažných změn.

Neúplnou helmintologickou pitvou byl u srnčete zjištěn velmi intenzivní nález *Capreocaulus capreoli*; u srny byl výskyt této plicnivky sporadický a u srnce byl nález negativní. Ve svalovině srdce srny a srnce byly v nativním preparátu (kompresní metodou) i histologicky detekovány cysty *Sarcocystis* spp. U všech tří zvířat byly nalezeny tři druhy kokcií rodu *Eimeria* (*E. capreoli*, *E. ponderosa*, *E. rotunda*) a hlístic gastrointestinálního traktu rodu *Haemonchus*, *Nematodirus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*.

Depistážní a orientační koprologické vyšetření srnčí zvěře ze dvou honiteb, z nichž pocházela uhynulá zvířata ukázalo, že v případě pozitivních nálezů cyst *Giardia* spp. ve vzorcích jejich trusu se vyskytovaly také v poměrně silné intenzitě oocysty kokcií, zejména druhů *E. capreoli* a *E. ponderosa*.

Intenzivnější byl v takovém trusu i výskyt nematodů v porovnání s negativními vzorky na přítomnost giardií.

Cysty *Giardia* spp. se vyskytovaly v parazitocenóze sedmi až devíti různých druhů endoparazitů. Jejich přítomnost a kombinace mohly mít pravděpodobně i určitý vliv na celkový zdravotní stav uhynulé srnčí zvěře, který se podle dlouhodobých studií autorů B u k o v j a n a P á v (1991) v našich honitbách v posledním období pozvolna zhoršuje. Není vyloučeno, že infekce giardiemi, podobně jako i u jiných oportunních nálezů, mohla propuknout právě proto, že srnče, srna i srnec tím, že mohli být z různých příčin oslabeni, byli asi i k tomuto střevnímu bičíkovci mnohem více vnímavější.

Zdroj giardiózní nákazy srnčí zvěře nám není znám. Pokud existuje možnost vzájemných přenosů infekcí mezi domácími a volně žijícími přežvýkavci, případně i jinými savci (což bude třeba exaktně prokázat), potom připadají v úvahu zejména telata, jehňata a mladé ovce na společných pastvinách, ale rovněž i nekontrolované hnojení různých ploch výkaly těchto domácích zvířat. Podle údajů P a v l á s k a (1984, 1988, 1989) jsou v našich podmínkách tato zvířata nakažena *Giardia* spp. v určitém období jejich odchovu prakticky stoprocentně.

Na základě uvedených předběžných výsledků z našich sledování frekvence výskytu střevního bičíkovce rodu *Giardia* u srnčí zvěře tedy vyplývá, že při studiu cirkulace nálezů giardiemi v životním prostředí je nutno brát v úvahu, že kromě domácích zvířat (pes, kočka, tele, jehně apod.) může být potenciálním zdrojem infekcí pro člověka (v případě, že nebude prokázána hostitelská specifita mezi izoláty giardií z různých hostitelů) i lovná zvěř.

L i t e r a t u r a

BREZA, M.: Niekoľko praktických poznatkov a námetov k helmintokoprologickéj diagnostike. *Helminťológia*, 1, 1957, s. 57-63.

BUKOVJAN, K. - PÁV, J.: Některé vnější vlivy působící na zdravotní stav srnčí zvěře v našich honitbách. *Veterinářství*, 41, 1991, s. 125-126.

BURET, A. - DEN HOLLANDER, N. - WALLIS, P. M. - BEFUS, D. - OLSON, M. E.: Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. *J. infect. Diseases*, 162, 1990, s. 231-237.

GASSER, R. B.: Is giardiasis a zoonosis? *Austral. veter. J.*, 67, 1990, s. 456.

HEALY, G. R.: Giardiasis in perspective: the evidence of animals as a source of human *Giardia* infections. In: MEYER, E. A. (ed.): *Giardiasis biomedical division*. 1990, s. 305-313.

PAVLÁSEK, I.: First record of *Giardia* spp. in calves in Czechoslovakia. *Folia. parazit. (Praha)*, 31, 1984, s. 225-226.

PAVLÁSEK, I.: Rozšíření *Giardia* spp. u jehňat v ČSSR. *Veter. Med. (Praha)*, 33, 1988, s. 255-256.

PAVLÁSEK, I.: Nejvýznamnější endoparazitární nákazy hospodářských zvířat. I. Kryptosporidie. II. a III. *Giardie a smíšené parazitární nákazy*. [Doktorská disertace.] České Budějovice, 1989, 599 s. Parazitologický ústav ČSAV.

Došlo 13. 4. 1993

The first report on *Giardia* spp. infection in roe deer (*Capreolus capreolus* L.)

Roe deer (*Capreolus capreolus* L.) is a representative of the new host of an intestinal flagellate of the genus *Giardia*. *Giardia* spp. was found during autopsy in three dead head of roe deer (roe deer calf 7 - 8 months, doe, buck) sent for examination to the State Veterinary Institute, Praha, from three different localities of the Czech Republic. Localization of the *Giardia* spp. was studied in the intestinal tract of the roe deer calf in native preparations in the intestinal contents and in the smears of intestinal mucosa stained after Giemsa (at a distance of 30 - 40 cm along the whole length of the small intestine). *Giardia* trophozoites were found in the small intestine in the section of 280 - 770 cm from the caudal part of duodenum. The trophozoites occurred most intensively within the section of 350 - 420 cm. The trophozoites showed active, motility in this part of the small intestine as late as in more than 48 hours after the death of the roe calf. Their size (obtained by measuring 30 trophozoites) was from 12.4 - 16.2 to 8 - 11.5 μm with the mean of 14.5 to 9.4 μm . In the contents of the caeca and colons of all three animals after death numerous *Giardia* cysts were found, in the caecum of the roe calf trophozoites were detected rarely. Most of the cysts were of ovoid shape. Their size, by measuring 50 cysts from each of the animals, was from 11.2 - 14.4 to 8 - 10.4 μm with the mean of 13.3 x 9.1 μm . Sporadically, nearly spherical cysts occurred (12.8 - 13.6 to 9.6 - 10.4 μm). The cysts of the *Giardia* spp. were found in one out of ten samples of excrements taken from the hunting ground with the history of roe calf death. From 24 samples of faeces examined coprologically, 14 from animals of less than two years of age and 10 from older animals from a locality with the history of roe deer buck death, the *Giardia* cysts were found in the mentioned categories of age always in one sample out of the examined excrements. The cysts of this protozoan were also found in two out of ten samples from another locality examined. Incomplete helminthological autopsy resulted in a very intensive finding of *Capreocaulus capreoli* in the lungs of the roe calf, the doe showed less intensive infection by this lungworm and the buck was negative. All three dead animals were infected by coccidia of the genus *Eimeria* (*E. capreoli*, *E. ponderosa*, *E. rotunda*) and by nematodes of the gastrointestinal tract of the genera *Haemonchus*, *Nematodirus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*. The hearts of the doe and the buck yielded numerous cysts of the *Sarcocystis* spp. *Giardia* cysts were present in excrements of the roe deer population from localities with the history of roe calf and buck death, above all, in the cases in which very intensive finding of oocysts of *E. capreoli*, *E. ponderosa* and *E. rotunda* in parasitocenosis with 5 - 6 genera of nematodes were proven simultaneously. The paper brings about brief characterization and description of the patho-anatomical finding in animals undergoing autopsy. In conclusion, epidemiological and epizootiological questions are discussed. The stress is laid on the need of further studies aimed at clarification of host specificity, possibility of mutual interchange and transmission of infection between domestic and free living animals, circulation of the *Giardia* cysts in the environment in order to discover potential sources and reservoirs of infections due to this protozoan causing human diseases.

Ing. Ivan Pavlášek, DrSc., MVDr. Ivan Nágl, MVDr. Jan Vácha,
MVDr. Miroslav Lávička, Státní veterinární ústav, Sídlištní 24/136,
165 03 Praha 6 - Lysolaje, Czech Republic

OBSAH — CONTENTS

Lazár L., Kolodzieyski L.: Steroidná dominancia, enzymatická aktivita a morfológický vzhľad buniek granulózy najväčších folikulov kráv - The effect of steroid dominant follicles upon enzymatic activity and the morphological shape of granulosa cells	321
Šmíd B., Valíček L., Rodák L., Kudrna J., Musilová J.: Elektronové mikroskopický príkaz viru epidemické diarhoey prasat v České republice - Electron microscopic demonstration of porcine epidemic diarrhoea in the Czech Republic	333
Neuschl J., Čižmarová J., Lopuchovský J.: Vplyv herbicídu bentazón československej proveniencie na invadovanosť oviec gastroenteronematodami - The effects of the herbicide bentazone of Czechoslovak origin on gastroenteronematode infestations of sheep	343
Krajničáková M., Bekeová E., Hednrichovský V., Maraček I.: Koncentrácie celkových lipidov, cholesterolu a progesterónu v čase synchronizácie ruje a v priebehu gravidity oviec - Concentrations of total lipids, cholesterol and progesterone in the period of oestrus synchronization and during gravidity of sheep	349
Bekeová E., Krajničáková M., Hednrichovský V., Maraček I.: Alkalická fosfatáza v puerpériu bahníc a jej vzťah k hormónom štítnej žľazy a ovariálnym steroidom - Alkaline phosphatase in the puerperium of ewes and its relation to thyroid hormones and ovarian steroids	359
Čorba J., Várady M., Praslička J., Veselý L.: Antihelmintické ovplyvnenie polyrezistentných nematódov gastrointestinálneho traktu u importovaných kôz - Anthelmintic control of multiple resistant gastrointestinal nematodes in imported goats	369
Juřicová Z., Hubálek Z., Halouzka J., Macháček P.: Virologické vyšetrení kormoránů velkých na arboviry - Virological examination of cormorants for arboviruses	375
INFORMACE	
Pavlásek I., Nágl I., Vácha J., Lávička M.: První nálezy <i>Giardia</i> spp. u srnce obecného (<i>Capreolus capreolus</i> L.)	381



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: ÚZPI Praha ● © 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, Hvožďanská 5-7, 149 00 Praha 4-Roztyly.