

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

7

ČNÍK 38 (LXVI)
AHA 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

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

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

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

Editor in Chief - Vedoucí redaktorka

Ing. Zdenka Radošová

HODNOTENIE NIEKTORÝCH UKAZOVATEĽOV BUNEČNEJ IMUNITY PO EXPERIMENTÁLNEJ INFЕКЦИИ VÍRUSOM IBR U TELIAT OŠETRENÝCH GLUKÁNOM

V. Hipíková¹, J. Mojžišová¹, V. Bajová¹, D. Takáčová¹, L. Strojný²

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

²Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice

Sledovali sme niektoré ukazovatele bunkou sprostredkovanej imunity (fagocytárnu aktivitu - FA a fagocytárny index - FI, metabolickú aktivitu a migračno-inhibičný faktor - MIF krvných leukocytov) u teliat experimentálne infikovaných vírusom IBR (II. skupina) a teliat premedikovaných glukánom 7 dní pred infekciou (I. skupina). U oboch skupín zvierat došlo k významnému zvýšeniu percentuálneho zastúpenia fagocytujúcich buniek v porovnaní s hodnotami pred infekciou na 2. - 4. deň experimentu ($P < 0,01$). Pri vzájomnom porovnávaní sledovaných skupín teliat sme zistili významný rozdiel v percentuálnom zastúpení fagocytujúcich buniek na 1. a 2. deň po infekcii ($P < 0,05$), s vyššími priemernými hodnotami u teliat len infikovaných. Pri hodnotení FI bol štatisticky preukázaný rozdiel zaznamenaný len u teliat ošetrovaných glukánom a to na 7. deň po jeho aplikácii ($P < 0,05$), t. j. v 0. deň experimentu. Inhibícia migračnej schopnosti leukocytov bola zaznamenaná už 1. deň po infekcii, s pretrvávaním po dobu 4 dní, bez podstatnejšieho rozdielu medzi skupinami. Pri hodnotení metabolickej aktivity leukocytov (INT-test) bol u teliat oboch skupín zaznamenaný pokles oproti východnej hodnote, bez podstatnejších rozdielov pri ich vzájomnom porovnaní.

teľa; bunkami sprostredkovaná imunita; vírus infekčnej bovinnej rinotracheitídy - IBR; glukán; fagocytárna aktivita; 2-(4 jodfenyl)-3-(4 nitrofenyl)-5-fenyltetrazolium chlorid; INT test; migračno-inhibičný faktor

Imunitná reakcia organizmu pri infekcii vírusom IBR ako aj inými herpesvírusmi je založená na interakcii širokej škály obranných mechanizmov infikovaného zvierata. V prípade vírusových infekcií, kde je dominantná virémia, najdôležitejšiu úlohu pri ich zvládnutí majú protilátky (R a g e r - Z i s m a n a A l l i s o n, 1973). Pri infekciách herpesvírusom, kde sa infekcia šíri z bunky na bunku prostredníctvom intracelulárnych prepojení, dôležitejšia ako protilátková odpoveď je reakcia bunkami sprostredkovanej imunity (N o t k i n s, 1974).

Funkčný stav fagocytujúcich buniek, zastúpených v krvi populáciou neutrofilných granulocytov a monocytov je jedným zo základných ukazovateľov bunkami sprostredkovanej imunokompetencie organizmu. Vplyv vírusovej infekcie na funkciu fagocytov sa môže prejaviť tak inhibíciou, ktorej dôsledkom je spomalená eliminácia antigénu, ako aj stimuláciou, ktorá elimináciu antigénu urýchľuje.

Briggs a i. (1988) uvádza u teliat infikovaných BHV-1 priamu alteráciu funkcie neutrofilov, vedúcu k predispozícii teliat na sekundárnu bakteriálnu pneumóniu.

V našej práci sme hodnotili niektoré ukazovatele bunečnej imunity pri IBR infekcii u teliat premedikovaných glukánom. Použitie imunomodulačných látok pri niektorých ochoreniach bolo popísané v prácach iných autorov (E u z e b y , 1986; F u s k a a i., 1987). Stimulačný účinok glukánu na fagocytárnu aktivitu krvných leukocytov uvádzajú S a n g r e t a i. (1990).

Pri hodnotení stavu celulárnej imunity sme v našej práci sledovali fagocytárnu aktivitu krvných leukocytov, metabolickú aktivitu a migračno-inhibičný faktor leukocytov. Na posúdenie ingescie schopnosti neutrofilných granulocytov a monocytov krvi sme použili mikrosférické hydrofilné partikuly - MSHP (V ě t v i ě k a a i., 1982). Pri posúdení ďalšej časti fagocytózy sme hodnotili metabolickú aktivitu polymorfonukleárných leukocytov INT testom. Schopnosť organizmu odpovedať na antigénny podnet sme hodnotili migračno-inhibičným testom.

MATERIÁL A METÓDY

EXPERIMENTÁLNE ZVIERATÁ

Do pokusu bolo zaradených 10 teliat vo veku 9 - 10 mesiacov. Všetky zvieratá boli klinicky zdravé, IBR-seronegativne, ustajnené v izolovanej maštali. Teľatá boli rozdelené do 2 skupín po 5 zvierat (skupina I, skupina II). Infekcia vírusom sa uskutočnila v 0. deň u všetkých zvierat. Zvieratám I. skupiny bol 7 dní pred experimentálnou infekciou aplikovaný glukán *i.m.* (rozpuštný, fungálny glukán - RNDr. Szechenyi, Mevak Nitra) v dávke 10 mg/kg živej hmotnosti.

EXPERIMENTÁLNA IBR INFEKCIA

Teľatá boli infikované intranazálne (do oboch nosných otvorov) 2 ml suspenzie BHV-1 o titri $10^{8,5}$ (suspenzia vírusu získaná od Doc. MVDr. Žuffu, DrSc., Mevak Nitra).

TEST FAGOCYTÁRNEJ AKTIVITY KRVNÝCH LEUKOCYTOV

Použili sme modifikovanú metódu ingescie MSHP (T o m a n a i., 1985; T o m a n a P š i k a l , 1985). Stanovili sme fagocytárnu aktivitu a fagocytárny index cirkulujúcich leukocytov, hodnoty fagocytujúcich neutrofilov vo vzťahu k diferenciálnemu rozpočtu leukocytov.

STANOVENIE TETRAZÓLIUM REDUKTÁZOVEJ AKTIVITY FAGOCYTOV (INT-TEST)

Separácia polymorfonukleárných leukocytov

Krv bola odobraná do heparínu (20 j./ml). Polymorfonukleárne leukocyty (PMNL) sme z krvi izolovali jednostupňovou separáciou na verografine metódou podľa B o y u m a (1976) s touto modifikáciou: Pri tejto separácii sedimentujú PMNL spolu s erytrocytami na dno skúmavky. Po odstránení vrchných vrstiev sme

k sedimentu erytrocytov s PMNL pridali 3-násobný objem 0,83 % NH_4Cl , premiešali a ponechali stáť pri laboratórnej teplote po dobu 5 - 10 minút za účelom odstránenia erytrocytov. Sediment buniek po odcentrifugovaní sme ešte trikrát premyli v PBS alebo MEM bez séra. Čisté PMNL sme resuspendovali v 1,5 - 2 ml MEM bez séra, spočítali, určili životnosť a nariedili na koncentráciu $1,5 \times 10^7$, potrebnú do INT testu.

INT test

Ako indikátor metabolických dejov prebiehajúcich vo fagocytytujúcich leukocytoch (vznik mikrobicídnych látok - najmä H_2O_2 a O_2^-) sme použili 2-(4-jodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-fenyltetrazolium chlorid - INT (Lachema Brno). Ako stimulujúci faktor sme použili zymozan (fy Sigma, USA). INT test sme robili v mikrouprave podľa literárnych údajov autorov Mareček a Procházková (1986). Hodnotenie: Na posúdenie funkčnej zdatnosti fagocytov je významný podiel medzi spontánnou aktivitou a aktivitou po pôsobení stimulancia, tzv. index metabolického vzplanutia, alebo index metabolickej aktivity (MA). Ten sme vypočítali podľa vzorca:

$$\text{Index MA} = \frac{\text{aktivita stimulovaných buniek}}{\text{aktivita nestimulovaných buniek}}$$

MIGRAČNO-INHIBIČNÝ TEST

Na stanovenie migračno-inhibičného faktora sme použili kapilárnu metódu (Bendixen, 1977). Ako nešpecifický antigén sme použili fytohemaglutinín. Izoláciu leukocytov sme robili podľa autorov Karlson a Kanek (1973). Migračný index sme vyjadrili:

$$\text{MI} = \frac{\text{plocha migrácie Le s antigénom}}{\text{aktivita migrácie Le bez antigénu}}$$

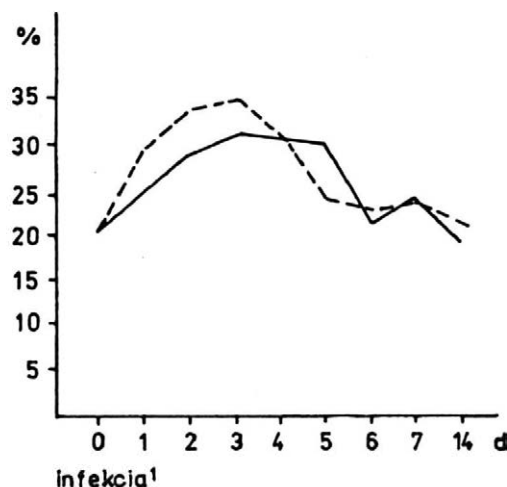
Za pozitívnu, antigén dependentnú inhibíciu migrácie spravidla poukazuje MI od 0,8 do 0,9.

ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

Hodnota percentuálneho zastúpenia jednotlivých druhov leukocytov, ich fagocytárnej aktivity a indexu ako aj hodnoty INT testu boli spracované párovým *T*-testom vo vzťahu k hodnotám pred infekciou. Na porovnanie hodnôt medzi I. a II. skupinou sme použili test zhody stredných hodnôt (Studentov *t*-test).

VÝSLEDKY

U obidvoch skupín zvierat experimentálne infikovaných vírusom IBR došlo k výrazne signifikantnému zvýšeniu percentuálneho zastúpenia fagocytytujúcich buniek na 2. a 3. deň po infekcii ($P < 0,01$), ktoré pretrváva aj na 4. deň po infekcii ($P < 0,05$) - obr. 1. U teliat, ktorým bol pred infekciou podaný glukán boli zaznamenané vyššie hodnoty FI leukocytov 7 dní po jeho aplikácii, t. j. v 0. deň experimentu ($P < 0,05$).



1. Dynamika hodnôt fagocytárnej aktivity leukocytov u teliat I. skupiny — a II. skupiny - - -
 The variation of the values of phagocytic activity of leucocytes in the calves of group I —
 and group II - - -
¹infection

Pri porovnaní obidvoch skupín zvierat sme zistili signifikantný rozdiel v hodnotách fagocytárnej aktivity leukocytov na 1. a 2. deň po infekcii ($P < 0,05$) s vyššími priemernými hodnotami u teliat, ktorým nebol pred infekciou podaný glukán. Na zvýšenie fagocytárnej odpovede organizmu sa v prevažnej miere podieľali neutrofilné granulocyty, pri ktorých bolo preukázané signifikantné zvýšenie percenta fagocytujúcich buniek (až na 80 %) na 2. a 3. deň po infekcii ($P < 0,01$) - tab. I.

Tieto zmeny korelujú so zistenou neutrofiliou, s vrcholom na 2. a 3. deň po infekcii ($P < 0,01$).

Hodnoty INT testu sú uvedené v tab. II. U obidvoch sledovaných skupín zvierat došlo k poklesu metabolickej aktivity stimulovaných aj nestimulovaných krvných fagocytov oproti 0. dňu. U skupiny teliat len experimentálne infikovaných došlo k signifikantnému zníženiu metabolickej aktivity stimulovaných PMNL na 1., 2., 4., 5. a 6. deň ($P < 0,05$) po infekcii, u nestimulovaných na 1. a 4. deň ($P < 0,01$), resp. 5. a 7. deň ($P < 0,05$) po infekcii oproti 0. dňu. Index metabolickej aktivity (MA) bol mierne zvýšený do 5. dňa po infekcii. Podobný priebeh v aktivite stimulovaných a nestimulovaných fagocytov bol zistený aj u skupiny teliat premedikovaných glukánom 7 dní pred infekciou - tab. II. Na rozdiel od skupiny teliat len infikovaných vykazoval index MA mierny pokles. Pri vzájomnom porovnaní obidvoch skupín zvierat nebola zistená výraznejšia odchýlka v sledovanom ukazovateli.

U sledovaných skupín teliat bola zhodne zaznamenaná inhibícia migračnej schopnosti krvných leukocytov, so započatím už v 1. deň po infekcii a pretrvávaním po dobu 4 dní - tab. III.

I. Fagocytárna aktivita leukocytov u teliat po infekcii vírusom IBR a premedikácii glukánom (I. skupina) a u teliat len po infekcii vírusom IBR (II. skupina) – The phagocytic activity of leucocytes in the calves after infection with IBR virus and glucane premedication (group I) and in calves only infected with IBR virus (group II)

		Deň ¹								
		0. infekcia ²	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	14
I. skupina ³	fagocytujúce leukocyty ⁴ (%)	21,6 ± 1,1	25,0 ± 1,4	28,4 ± 4,3	32,5 ± 5,0	31,8 ± 7,3	29,4 ± 6,1	22,4 ± 6,1	24,8 ± 5,0	18,2 ± 6,3
	fagocytárny index leukocytov ⁵	9,0 ± 1,7	7,3 ± 0,9	7,4 ± 2,7	7,7 ± 1,9	7,6 ± 0,5	6,6 ± 1,6	5,3 ± 0,8	8,0 ± 1,9	6,7 ± 1,9
	fagocytujúce neutrofily ⁶ (%)	52,9 ± 8,5	65,5 ± 7,3	73,5 ± 6,4	77,3 ± 7,4	78,9 ± 8,3	71,0 ± 9,7	67,0 ± 8,6	70,4 ± 7,9	66,8 ± 8,7
	fagocytárny index neutrofilov ⁷	12,1 ± 1,5	14,1 ± 0,7	11,6 ± 3,3	9,8 ± 2,5	10,3 ± 0,9	9,9 ± 2,3	8,3 ± 1,0	13,2 ± 2,2	7,2 ± 0,3
	neutrofily ⁸ (%)	27,4 ± 2,6	33,0 ± 4,5	38,0 ± 3,8	41,0 ± 7,6	38,0 ± 6,3	36,0 ± 5,9	32,0 ± 6,4	34,0 ± 4,4	30,0 ± 7,8
II. skupina ³	fagocytujúce leukocyty ⁴ (%)	21,0 ± 4,4	29,4 ± 3,6	34,0 ± 3,2	34,7 ± 4,5	30,8 ± 6,6	24,8 ± 2,7	23,4 ± 5,6	24,6 ± 1,5	21,6 ± 2,3
	fagocytárny index leukocytov ⁵	7,3 ± 1,7	7,3 ± 0,9	8,3 ± 0,9	8,2 ± 1,3	8,1 ± 1,0	6,8 ± 1,6	6,3 ± 1,9	6,6 ± 1,0	6,7 ± 1,2
	fagocytujúce neutrofily ⁶ (%)	58,9 ± 5,2	66,5 ± 4,8	80,0 ± 5,7	77,1 ± 4,9	76,3 ± 6,8	61,6 ± 1,9	65,0 ± 2,4	65,7 ± 3,2	65,9 ± 4,9
	fagocytárny index neutrofilov ⁷	8,5 ± 1,1	8,1 ± 0,9	9,4 ± 1,6	9,3 ± 0,7	10,5 ± 1,5	8,7 ± 2,1	7,4 ± 2,8	7,8 ± 1,9	8,1 ± 0,8
	neutrofily ⁸ (%)	29,4 ± 7,8	40,4 ± 5,8	46,0 ± 4,5	43,8 ± 6,6	38,6 ± 6,1	38,6 ± 6,1	38,4 ± 2,5	34,8 ± 6,8	37,0 ± 6,9

¹ day, ² infection, ³ group, ⁴ phagocytizing leucocytes, ⁵ leucocyte phagocytic index, ⁶ phagocytizing neutrophils, ⁷ neutrophil phagocytic index, ⁸ neutrophils

II. Hodnoty INT testu u teliat infikovaných vírusom IBR a premedikovaných glukánom (I.skupina) a teliat infikovaných len vírusom IBR (II. skupina) – The values of INT test in the calves infected with IBR virus and glucane premedicated (group I) and in the calves only infected with IBR virus (group II)

Deň ¹	I. skupina ³			II. skupina ³		
	stimulované bunky (zymozan) ⁴	nestimulované bunky ⁵	index metabolickej aktivity ⁶	stimulované bunky (zymozan) ⁴	nestimulované bunky ⁵	index metabolickej aktivity ⁶
0. infekcia ²	0,226 ± 0,039	0,119 ± 0,013	1,897 ± 0,160	0,194 ± 0,031	0,114 ± 0,012	1,688 ± 0,127
1.	0,156 ± 0,048*	0,099 ± 0,024*	1,557 ± 0,256	0,148 ± 0,015*	0,078 ± 0,015**	1,959 ± 0,390
2.	0,163 ± 0,035	0,104 ± 0,013	1,547 ± 0,183	0,155 ± 0,026*	0,093 ± 0,031	1,715 ± 0,510
3.	0,205 ± 0,018	0,114 ± 0,026	1,870 ± 0,448	0,169 ± 0,029	0,099 ± 0,028	1,760 ± 0,301
4.	0,210 ± 0,148	1,123 ± 0,080	1,698 ± 0,344	0,145 ± 0,028*	0,081 ± 0,016**	1,840 ± 0,469
5.	0,121 ± 0,011**	0,066 ± 0,011**	1,895 ± 0,520	0,151 ± 0,011*	0,072 ± 0,021*	2,265 ± 0,761
6.	0,118 ± 0,028*	0,097 ± 0,021	1,216 ± 0,134**	0,146 ± 0,030*	0,098 ± 0,020	1,493 ± 0,137
7.	0,128 ± 0,032**	0,137 ± 0,027	0,942 ± 0,173**	0,177 ± 0,033	0,14 ± 0,013*	1,270 ± 0,288*
14.	0,208 ± 0,043	0,089 ± 0,028	2,417 ± 0,489	0,180 ± 0,039	0,108 ± 0,018	1,694 ± 0,488

* = $P < 0,05$

** = $P < 0,01$

For 1 - 3 see Tab. I; ⁴stimulated cells, ⁵unstimulated cells, ⁶metabolic activity index

III. Priemerné hodnoty migračného indexu (MI) leukocytov u teliat infikovaných vírusom IBR a premedikovaných glukánom (I. skupina) a teliat infikovaných len vírusom IBR (II. skupina) – The average values of migration index (MI) of leucocytes in the calves infected with IBR virus and glucane-premedicated (group I) and in the calves only infected with IBR virus (group II)

	Deň ¹								
	0. infekcia ²	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	14.
I. skupina ³	0,90	0,86	0,88	0,88	0,89	0,94	0,94	0,97	1,00
II. skupina ³	0,91	0,88	0,88	0,87	0,92	0,98	0,95	0,96	0,99

Pozitívna antigén dependentná inhibícia migrácie: MI < 0,8 - 0,9 – Positive antigen-dependent inhibition of migration: MI < 0.8 - 0.9

Reakcia bez odozvy: MI = 0,9 - 1,1 – Reaction without response: MI = 0.9 - 1.1

For 1 - 3 see Tab. I

DISKUSIA

Výsledky našej práce ukazujú, že experimentálna infekcia teliat vírusom IBR ovplyvňuje funkciu polymorfonukleárných buniek tak v smere zvýšenia ich percentuálneho zastúpenia, ako aj zvýraznenia ich fagocytárnej schopnosti, na čom sa v prevažnej miere podieľali neutrofilné granulocyty. Zvýšenú ingesciu opsinizovaných partikul u teliat infikovaných vírusom IBR zaznamenali v svojich štúdiách aj B r i g g s a i. (1988). Výraznú neutrofiliu a zvýšenú fagocytárnu aktivitu neutrofilov pri IBR infekcii popisujú aj D ě r k a a P o s p í š i l (1987). Podobne aj T o m a n a i. (1985) zaznamenali zvýšenie fagocytárnej aktivity v priebehu rotavírusovej infekcie u bezkolostrálnych teliat. Naproti tomu, R o t h a i. (1986) popisujú alteráciu *in vitro* ingescie *Staphylococcus aureus* a neutrofilov počas perzistujúcej BVDV infekcie. O h m a n a i. (1987) zasa uvádzajú pri BVDV infekcii výraznú aktiváciu monocytov. V dynamike fagocytárneho indexu leukocytov neboli v priebehu experimentu zistené výraznejšie výkyvy. Je však potrebné upozorniť na to, že signifikantný rozdiel v hodnote FI ($P < 0,05$) pri porovnávaných skupinách zvierat je v dôsledku stimulačného vplyvu glukánu (podaný 7 dní pred infekciou) na uvedený ukazovateľ.

Podobne potencujúci efekt glukánu na úroveň tohto ukazovateľa u teliat popisujú aj S a n g r e t a i. (1988), P a u l í k a i. (1992) a L e v k u t o v á a i. (1992).

Pozitívne hodnoty migračno-inhibičného testu 1. deň po infekcii umožňujú predpokladať, že uvoľnenie migračno-inhibičného faktora bolo navodené prítomnosťou vírusu v organizme.

Pozitívny MIF bol zistený aj pri rade infekčných chorôb (brucelóza, pertussis, kandidóza, streptokokové infekcie a iné), pričom je testovanie spoľahlivejšie ako sérologické vyšetrenie a obchádza riziká vyšetrenia *in vivo* (G ó r s k i a i., 1973).

Redukcia INT v leukocytoch nie je náhodný jav, ale odzrkadľuje aktuálny metabolický stav leukocytu. V metabolickom mechanizme môže dôjsť k rôznym po-

ruchám, čo potom môže klinicky vyústiť do chorobného stavu. Napr. neschopnosť leukocytov redukovať tetrazóliové soli sa klinicky diagnostikuje ako chronická granulomatózna choroba (F e r e n č í k a i., 1991). Vyššia aktivita krvných fagocytov, hodnotená INT testom bola zaznamenaná pri pyogénnych infekciách, u celej rady bakteriálnych chorôb, aj po imunizácii (B j ö r k s t é n a i., 1976; P a r k a i., 1968; S e g a l, 1974; G r a n á t o v á, 1989). Znížené hodnoty metabolickej aktivity boli pozorované po stresovej záťaži ako u ľudí, tak aj u zvierat (G r a n á t o v á, 1989). Súvisí to s rôznym stupňom imunosupresie, ktorá nasleduje po stresovej záťaži. Inhibičný účinok na funkciu krvných fagocytov sa prejavuje aj po vírusovej infekcii (B r i g g s a i., 1988). Imunosupresívny účinok vírusu BHV-1 uvádzajú M u n e e r a i., (1988). V našich pokusoch po experimentálnej infekcii u teliat s vírusom IBR došlo k zníženiu INT-reduktázovej aktivity fagocytov, čo je v zhode s literárnymi údajmi (prejavil sa imunosupresívny účinok vírusovej IBR infekcie).

Podobne k zníženiu došlo aj v prípade, keď teľatá boli 7 dní pred experimentálnou infekciou ošetrované glukánom. Hoci niektorí autori uvádzajú zvýšenie INT-reduktázovej aktivity po aplikácii glukánu v PMNL u morčiat aj u ľudí (F e r e n č í k a i., 1986, 1988), v našich pokusoch zrejme prevládol imunosupresívny účinok vírusu a to, že glukán bol aplikovaný až 7 dní pred experimentálnou infekciou. V pokuse je teda potrebné zvážiť relatívne dlhú dobu od aplikácie glukánu po infekciu a v ďalších pokusoch by bolo vhodné upraviť časovú schému pokusu.

Literatúra

BENDIXEN, P. H.: Application of the direct leucocyte - migration test in cattle naturally infected with *M. paratuberculosis*. Amer. J. veter. Res., 38, 1977, s. 66-73.

BJÖRKSTEN, B. - NYSTRÖM, K. - LINDQUIST, B.: The NBT-test in endemic benign neuropathy. Acta med. scand., 199, 1976, s. 147-149.

BOYUM, A.: Isolation of Lymphocytes. Granulocytes and Macrophages. Scand. J. Immunol., 5, 1976, s. 9-15.

BRIGGS, R. E. - KEHRLI, M. - FRANK, G. H.: Effect of infection with parainfluenza - 3 virus and infectious bovine rhinotracheitis virus on neutrophil functions in calves. Amer. J. veter. Res., 49, 1988, s. 682-686.

DĚRKA, J. - POSPÍŠIL, R.: Hodnocení syntetické aktivity jaderka lymfocytu a fagocytární aktivity leukocytu periferní krve u skotu po infekci virem IBR. Veter. Med. (Praha), 32, 1987, s. 595-601.

EUZEY, J. P.: Applications on medicine veterinaire at effects secondaires. Rev. Méd. vétér., 137, 1986, s. 499-520.

FERENČÍK, M. - KOTULOVÁ, D. - MASLER, L. - BERGENDI, L. - ŠANDULA, J.: Modulatory effect of glucans on the functional and biochemical activities of guinea-pig macrophages. Meth. Findl. Exp. clin. Pharmacol., 8, 1986, s. 163-166.

FERENČÍK, M. - KOTULOVÁ, D. - MASLER, L. - ŠANDULA, J. - PRUŽINEC, P.: Imunomodulačný účinok glukánov na profesionálne fagocyty. Bratisl. lek. Listy, 89, 1988, s. 424-432.

FERENČÍK, M. - KAČANI, L. - BERGENDI, L.: Kľúčový význam NADPH-oxidázy a NO-syntázy pre funkčné prejavy profesionálnych fagocytov. Imunol. Zprav., 1991, č. 2, s. 27.

FUSKA, J. - ROVENSKÝ, J. - PROSKA, B.: Imunomodulačné látky izolované z mikroorganizmov. Chem. Listy, 81, 1987, s. 363-386.

- GÓRSKI, A. - MADALINSKÁ, M. - DROSCZ, W.: Cellular immunity in man assessed by indirect migration inhibition test using murine spleen leukocytes. *Biomed. Experiments*, 19, 1973, č. 1, s. 19-21.
- GRANÁTOVÁ, M.: Použití testu redukce tetrazoliové soli k průkazu fagocytární aktivity u prasat. *Veter. Med. (Praha)*, 24, 1989, s. 231-238.
- KARLSSON, I. - KANEKO, A.: Isolation of leucocytes from bovine peripheral blood. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 142, 1973, s. 853-856.
- LEVKUTOVNÁ, M. - BAJOVÁ, V. - HIPÍKOVÁ, V. - MOJŽISOVÁ, J. - HARVAN, M. - HUDÁK, P.: Vplyv nerozpustného fungálneho glukánu na niektoré ukazovatele imunity teliat. *Vet. Med. - Czech*, 38, 1993, s. 31-42.
- MAREČEK, D. - PROCHÁZKOVÁ, J.: Mikro-INT.test. PROCHÁZKOVÁ, J. - JOHN, C. (eds): *Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie*. Praha, asicenum 1986, s. 219-222.
- MUNEER, M. A. - FARAH, I. O. - MEWMAN, H. A. - FOYAL, S. M.: Immunosuppressions in animals. *Brit. veter. J.*, 144, 1988, s. 288-300.
- NEUWIRTOVÁ, R. - ŠETKOVÁ, O. - MEZTEKOVÁ, J. - DONNER, L.: Poznámky k provedení nitrobluetetrazoliového (NBT) testu a jeho význam pro vyšetření funkce leukocytu. *Vnitřní lékařství*, 23, 1977, s. 647-654.
- NOTKINS, A. L.: Immune mechanisms by which the spread of viral infections is stopped. *Cell. Immunol.*, 11, 1974, s. 478-483.
- OHMANN, B. H. - RONDHOLT, L. - BLOCH, B.: Demonstration of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood mononuclear cells of persistently infected, clinically normal cattle. *J. gen. Virol.*, 68, 1987, s. 1971-1982.
- PARK, B. H. - FIKRIG, S. M. - SMITHWICK, E. M.: Infection and nitroblue-reduction by neutrophils. *Lancet*, 2, 1968, s. 532-534.
- PAULÍK, Š. - BAJOVÁ, V. - MOJŽISOVÁ, J.: Vplyv aplikácie nerozpustného fungálneho glukánu na úroveň oneskorenej kožnej precitlivlosti a fagocytárnu aktivitu krvných leukocytov u teliat. *Vet. Med. (Praha)*, 37, 1992, s. 577-585.
- ROTH, J. A. - BOLIN, S. R. - FRANK, D. E.: Lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Amer. J. veter. Res.*, 47, 1986, s. 1139-1141.
- RAGER-ZISMAN, B. - ALLISON, A. C.: Effect immunosuppression on coxsackie B-3 virus infection in mice and passive protection by circulating antibody. *J. Gen. Virol.*, 19, 1973, s. 339-351.
- SANGRET, M. - BAJOVÁ, V. - HIPÍKOVÁ, V. - MOJŽISOVÁ, J. - VILČEK, Š. - VRTIAK, O. J. - KUČA, V. - LEVKUTOVÁ, M.: Imunostimulácia teliat glukánom. *Zbor. Ref. 5. kongres čs. imunológov*, Plzeň, 1988, s. 59.
- SANGRET, M. - BAJOVÁ, V. - MOJŽISOVÁ, J. - LEVKUTOVÁ, M. - VILČEK, Š. - KUČA, V. - VRTIAK, O. J. - HARVAN, M.: Sledovanie imunostimulačného účinku karboxymetylglukínu pri teľatách. *Zbor. Ref. Glukány a iné imunomodulačné polysacharidy*, Stará Lesná, 1990, s. 28.
- SEGAL, A. W.: Nitroblue-tetrazolium tests. *Lancet*, 2, 1974, s. 1248-1252.
- TOMAN, M. - PŠIKAL, I.: Test fagocytární aktivity krevních leukocytů u telat. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985, s. 393-400.
- TOMAN, M. - PŠIKAL, I. - MENŠÍK, J.: Fagocytární aktivita krevních leukocytů telat od narození do věku tří měsíce. *Vet. Med. (Praha)*, 30, 1985, s. 401-408.
- VĚTVIČKA, V. - FORNUSEK, I. - KOPEČEK, J. - KAMÍNKOVÁ, J. - KAŠPÁREK, I. - VRÁNOVÁ, M.: Phagocytosis of human leukocytes: A simple micromethod. *Immunol. Lett.*, 5, 1982, s. 97-100.

Došlo 31. 12. 1992

HIPÍKOVÁ, V. - MOJŽIŠOVÁ, J. - BAJOVÁ, V. - TAKÁČOVÁ, D. - STROJNÝ, L. (University of Veterinary Medicine, Košice; Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice):

Evaluation of some parameters of cellular immunity after experimental infection with IBR virus in glucane-treated calves.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (7) : 385-394.

Some parameters of cell-mediated immunity (phagocytic activity PA and phagocytic index PI, metabolic activity and migration-inhibitive factor MIF of blood leucocytes) were investigated in calves experimentally infected with IBR virus (group II) and in calves premedicated with glucane seven days before infection (group I). A significant increase in the percentage of phagocytizing cells was observed in both groups of animals on days 2 - 4 of the experiment ($P < 0.01$) in comparison with the values before infection. If the two groups of animals were confronted with each other, there was a significant difference in the percentage of phagocytizing cells on days 1 and 2 after infection ($P < 0.05$), with the higher average values in the calves which were only infected. An evaluation of PI showed a statistically significant difference only in the glucane-treated calves on day 7 after its administration ($P < 0.05$), i.e. on day zero of the experiment. The inhibition of leucocyte migration ability was found on day 1 after infection, and it persisted for four days, without any significant differences between the groups. An evaluation of the metabolic activity of leucocytes (INT-test) showed a decrease in the calves of both groups in comparison with the initial value, without any significant differences when the values were confronted with each other.

calf; cell-mediated immunity; infectious bovine rhinotracheitis virus - IBR; glucane; phagocytic activity; 2-(4 iodophenyl)-3-(4 nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride; INT-test; migration-inhibitive factor

Contact Address:

RNDr. Vlasta Hipíková, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73,
041 81 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 32111-15, fax 095 767675

ÚROVEŇ ONESKORENEJ PRECITLIVELOSTI A PRIMÁRNEJ PROTILÁTKOVEJ ODPOVEDE PO APLIKÁCIÍ INAKTIVOVANEJ OLEJOVEJ IBR VAKCÍNY U TELIAT PREMEDIKOVANÝCH GLUKÁNOM

Š. Paulík¹, V. Bajová¹, G. Benko²

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

²Štátny veterinárny ústav, Košice

Hodnotili sme úroveň oneskorenej kožnej precitlivlosti (OKP) k DNFB a primárnej protilátkovej odpovede u teliat imunizovaných inaktivovanou olejovou IBR vakcínou (skupina V) a teliat premedikovaných glukánom (7 dní pred podaním vakcíny) a následne imunizovaných (skupina GV) uvedenou vakcínou. Testom OKP nebola zistená alterácia celulárnej imunitnej reaktivity u teliat imunizovaných inaktivovanou olejovou IBR vakcínou; po aplikácii vakcíny nepreukázala intenzita OKP signifikantný rozdiel ani oproti hodnote pred aplikáciou vakcíny, ani v porovnaní k hodnote u kontrolných teliat (skupina K) - tab. I. Pri imunizovaných teľatách, ktoré však boli premedikované glukánom (z *Pleurotus ostreatus*; 10 mg/kg ž.h.) bola zistená signifikantne vyššia úroveň OKP nielen oproti jej počiatočnej hodnote ($P < 0,05$; pred aplikáciou glukánu), ale aj hodnote u kontrolných teliat ($P < 0,05$) - tab. I. Na imunomodulačný vplyv glukánu v tomto smere poukazuje aj kategorizácia teliat podľa intenzity OKP (obr. 1); kým hodnota kožnej reakcie sa v termínoch pred a po aplikácii uvedených preparátov pohybovala u najväčšieho percenta teliat skupiny V a K v rozpätí 3,6 - 6,5 mm, pri teľatách skupiny GV bol zistený výrazný nárast (v termíne po aplikácii) počtu teliat (z 22 % na 67 %) s hodnotou kožnej reakcie nad 6,5 mm. Samotné podanie vakcíny (skupina V) neindukovalo tvorbu merateľného množstva sérových anti-IBR protilátok do 14. dňa po imunizácii. U teliat premedikovaných glukánom (skupina GV) začal vývoj primárnej protilátkovej odpovede s týždenným predstihom, t. j. už po 7. dni po vakcinácii; v 2. týždni boli protilátky preukázané u 44 % z vyšetovaných teliat, s priemerným titrom 1 : 6,2. V 3. týždni experimentu boli sérové protilátky zistené u 78 % teliat skupiny V (priemerný titer 1 : 28,4) a u 67 % teliat skupiny GV (priemerný titer 1 : 13,3); uvedený rozdiel v koncentrácii sérových protilátok nebol štatisticky preukazný. Potom titer protilátok mal klesajúcu tendenciu u oboch skupín teliat, s takmer rovnakými hodnotami v 4. týždni po vakcinácii (skupina V = 1 : 3,5; skupina GV = 1 : 4,4) - obr. 2.

teľa; oneskorená kožná precitlivosť; sérové protilátky; glukán; vakcinácia; infekčná boviná rinotracheitída

Nevyhnutným opatrením v boji proti IBR je preventívna vakcinácia, pri ktorej sú využívané živé i inaktivované vakcíny (K a h r s, 1977; P o s p í š i l, 1991). Kým so živými IBR vakcínami je spájaná imunosupresia, pri inaktivovaných IBR

vakcínach zatiaľ takéto údaje chýbajú (Van Donkersgoed a Babiuk, 1991).

Glukány sú polysacharidové látky mikrobiálneho pôvodu (Whistler a i., 1976); modulujú bunkou sprostredkovanú a humorálnu imunitu, mechanizmy nešpecifickej imunity i hematopoézu (Ferenčík a Bergendi, 1990). V rámci týchto účinkov bol ich stimulačný vplyv zistený aj pri oneskorenej precitlivelosti (Pérez a i., 1984; Paulík a i., 1992a,b) a protilátkovej odpovedi (Benda a Mádr, 1991; Wagnerová a i., 1991).

Práca bola zameraná na posúdenie úrovne bunečnej imunitnej kompetencie *in vivo* a primárnej protilátkovej odpovede u teliat po aplikácii inaktivovanej olejovej IBR vakcíny a jej kombinácie s premedikáciou glukánu.

MATERIÁL A METÓDA

EXPERIMENTÁLNE ZVIERATÁ

Do sledovania bolo zaradených 27 klinicky zdravých teliat, veku 4,5 - 5,5 mesiacov; všetky boli IBR-séronegatívne. Teľatá boli rozdelené do 3 skupín (po 9 zvierat), s približne rovnakou úrovňou oneskorenej kožnej precitlivelosti (OKP), ktorá bola stanovená jeden týždeň pred započatím experimentu. Prvá skupina teliat (skupina K) slúžila ako kontrola (bez aplikácie glukánu a vakcíny); zvieratám druhej skupiny (skupina V) bola aplikovaná IBR vakcína; teľatám tretej skupiny (skupina GV) bol podaný glukán a následne IBR vakcína.

VAKCÍNA A GLUKÁN

K imunizácii bola použitá inaktivovaná olejová IBR vakcína-Borinak (Mevak a.s., Nitra) aplikovaná v množstve 2 ml intramuskulárne, jednorázovo na začiatku experimentu (0. deň).

Glukán (partikulárny; fungálny-*Pleurotus ostreatus*; Mevak a.s., Nitra) bol aplikovaný subkutánne, 10 mg/kg ž. h., sedem dní pred aplikáciou vakcíny.

KVANTIFIKÁCIA CELULÁRNEJ IMUNITY

Úroveň celulárnej imunitnej odpovede *in vivo* bola hodnotená testom oneskorenej kožnej precitlivelosti (OKP) po indukcii dinitrofluorobenzénom (DNFB) podľa metodického postupu autorov Paulík a Vrzgula (1989) so zmenou v spôsobe aplikácie (intradermálne) a v koncentrácii DNFB (0,2 %) pri provokácii. Intenzita kožnej reakcie bola hodnotená mikrometrom (s presnosťou na 0,01 mm) a vyjadrená ako lokálne zhrubnutie kože (LZK) v milimetroch. LZK predstavuje rozdiel hodnoty kožnej reakcie pred a 24 hodín po provokácii. Intenzita bunečnej imunitnej odpovede k DNFB u sledovaných skupín teliat bola stanovená jeden týždeň pred započatím experimentu a za 3 týždne od aplikácie IBR vakcíny. Test OKP je citlivým a kvantifikovateľným merítkom úrovne celulárnej imunity *in vivo* u hovädzieho dobytku (Reddi a i., 1981).

Titer anti-IBR sérových protilátok bol určený metódou VNT na MDBK bunkách (Ž u f f a i., 1982) v nasledovných termínoch: pri výbere zvierat do experimentu (3 týždne pred aplikáciou vakcíny); v 0. deň a v 1., 2., 3. a 4. týždeň experimentu.

ŠTATISTICKÁ ANALÝZA

K sledovaniu zmien v intenzite oneskorenej kožnej precitlivosti (OKP) k jej hodnotám pred vakcináciou bol použitý párový *t*-test (*Pt*-test). Hodnoty OKP a titru anti-IBR sérových protilátok boli u sledovaných skupín teliat vzájomne porovnávane v jednotlivých termínoch sledovania Studentovým *t*-testom (P o l á č e k , 1984).

VÝSLEDKY

OPOZDENÁ PRECITLIVLOSŤ K DNFB

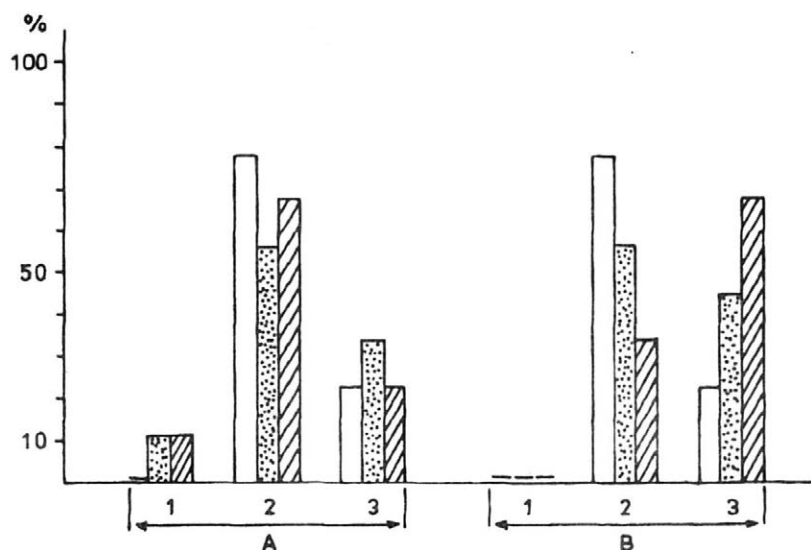
Účelom sledovania bolo zhodnotiť efekt IBR vakcinácie samotnej alebo jej kombinácie s premedikáciou glukánu na funkčnú aktivitu T lymfocytovej populácie *in vivo* bez ohľadu na špecifitu procesu k vakcinačnému antigénu a na špecifickú primárnu protilátkovú odpoveď.

Priemerná hodnota LZK u všetkých sledovaných teliat ($n = 27$) poukazuje na jej minimálny rozdiel medzi úrovňou pred ($\bar{x} = 5,74 \pm 1,37$ mm; rozpätie 3,2 - 8,3 mm) a po ($\bar{x} = 6,22 \pm 1,42$ mm; rozpätie 4,0 - 9,2 mm) započatí experimentu. V týchto termínoch sledovania však došlo k zmene v percentuálnom zastúpení teliat, ak tieto boli rozdelené do kategórií podľa intenzity OKP (obr. 1). Kým v rámci skupiny K a skupiny V najvyššie percento teliat preukázalo počas doby sledovania (t. j. v A a B termíne) úroveň OKP v hodnotách 3,6 - 6,5 mm, u zvierat skupiny GV bol v druhom termíne pozorovania (B) zaznamenaný výrazný nárast percenta teliat (z 22 % na 67 %) s kožnou reakciou vyššou než 6,5 mm.

Skupinové hodnotenie teliat túto analýzu potvrdilo (tab. I). Zatiaľ čo u teliat skupiny K sme v 3. týždni experimentu zaznamenali približne rovnakú intenzitu kožnej reakcie ako v termíne pred započatím experimentu, teľatá skupiny GV preukázali signifikantne vyššiu úroveň OKP nielen v porovnaní k jej počiatkovej hodnote ($P < 0,05$), ale aj k hodnote u teliat skupiny K ($P < 0,05$). Vzostup priemernej hodnoty LZK u teliat skupiny V nebol štatisticky preukazný.

SYSTEMICKÁ PROTILÁTKOVÁ ODPOVEĎ K IBR VAKCÍNE

Samotné podanie vakcíny (teľatá skupiny V) neindukovalo tvorbu merateľného množstva sérových anti-IBR protilátok do 14. dňa po imunizácii. V ďalších termínoch sledovania boli protilátky preukázané u 7 (78 %) a 3 (33 %) z vyšetovaných teliat, s priemerným titrom 1 : 28,4 $\pm$ 39,6 v 3. týždni a 1 : 3,6 $\pm$ 5,8 v 4. týždni po imunizácii. V porovnaní k nim u teliat premedikovaných glukánom a následne imunizovaných (skupina GV) vývoj primárnej protilátkovej odpovede začal s týždenným predstihom. V 2. týždni po vakcinácii boli sérové protilátky zistené u 4 (44 %) zo sledovaných teliat, s priemerným titrom 1 : 6,2 $\pm$ 7,8 a v 3. týždni u 6 (67 %)



1. Percentuálne zastúpenie teliat imunizovaných (□), premedikovaných glukánom a vakcinovaných (▨) a kontrolných (▤) podľa intenzity oneskorenej kožnej precitlivosti k DNFB. Hodnoty kožnej reakcie: 1 = do 3,5 mm; 2 = 3,6 - 6,5 mm; 3 = nad 6,5 mm. Sledovanie: A = pred započatím experimentu; B = 3. týždeň po aplikácii vakcíny – The percentages of immunized (□), glucane-premedicated and vaccinated (▨) and control (▤) calves according to the level of delayed skin hypersensitivity to DNFB. The values of skin test: 1 = less than 3.5 mm; 2 = 3.6 - 5.5 mm; 3 = more than 6.5 mm. Observation: A = before the beginning of the experiment; B = the 3rd week after vaccine administration

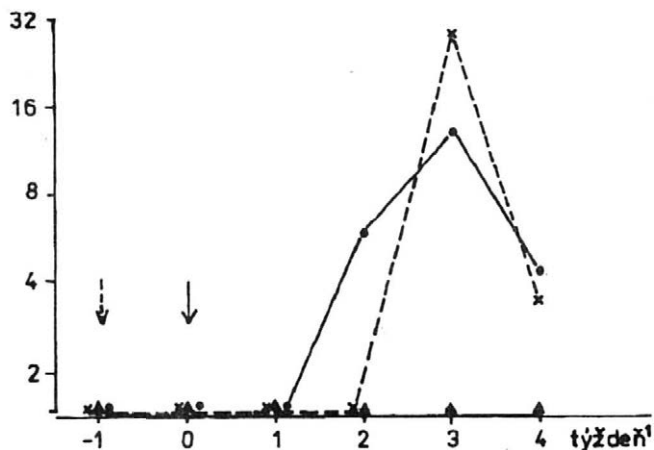
I. Úroveň oneskorenej kožnej precitlivosti k DNFB po aplikácii IBR vakcíny a jej kombinácie s premedikáciou glukánu – The level of delayed skin hypersensitivity to DNFB after IBR vaccine administration and after its combination with glucane premedication

Skupina ¹	Kožná reakcia ² (mm ± s)		Pt-test*
	1. týždeň pred aplikáciou vakcíny ³	3. týždeň po aplikácii vakcíny ⁴	
K	5,84 ± 1,17	5,41 ± 0,96 ^a	P > 0,05
V	5,64 ± 1,54	6,44 ± 1,68	P > 0,05
GV	5,73 ± 1,51	6,80 ± 1,28 ^a	P < 0,05

Studentov t-test: a = P < 0,05 - Student's t-test: a = P < 0.05

* = t-test pre párované hodnoty - t-test for matched pairs

¹group, ²skin test, ³1st week before vaccine administration, ⁴3rd week after vaccine administration



2. Titer sérum-neutralizačných anti-IBR vírusových protilátok (os y) po aplikácii IBR vakcíny u teliat len vakcinovaných (x), premedikovaných glukánom a vakcinovaných (●) a nevakcinovaných (▲). Aplikácia glukánu (---→), aplikácia IBR vakcíny (—→) – The titres of serum-neutralizing IBR virus antibodies (y-axis) after IBR vaccine administration to the calves vaccinated only (x), glucane-premedicated and vaccinated (●), and unvaccinated calves (▲). Glucane administration (---→), IBR vaccine administration (—→)

teliat, s priemerným titrom $1 : 13,3 \pm 12,6$. Rozdiel v koncentrácii anti-IBR sérových protilátok v 21. deň po imunizácii nebol u týchto dvoch skupín teliat štatisticky preukazný. Pri kontrolných teľatách neboli sérum-neutralizačné anti-IBR protilátky detegované počas celej doby sledovania (obr. 2).

DISKUSIA

Bunkou sprostredkovaná imunita zohráva dôležitú úlohu v obrane proti mnohým vírusovým pôvodcom, medzi ktoré patrí aj BHV-1 (Cook a Splitter, 1989). Pri experimentálnej infekcii vírusom IBR dochádza súčasne k stimulácii jedných a k redukcii iných funkčných aktivít buniek imunitného systému (Griebel a i., 1987/88; Briggs a i., 1988 a ďalší). Kým pri použití živých IBR vakcín môže dochádzať k imunosupresii, pri inaktivovaných vakcínach zatiaľ takéto údaje nie sú k dispozícii (Van Donkersgoed a Babiuk, 1991). Funkčná kapacita lymfocytovej populácie môže byť hodnotená *in vivo* (oneskorená kožná precitlivosť) a *in vitro* (napr. blasttransformačný test, test inhibície migrácie leukocytov) metódami.

Testom oneskorenej kožnej precitlivosti sme nezaznamenali ovplyvnenie celulárnej imunitnej reaktivity u teliat imunizovaných inaktivovanou olejovou IBR vakcínou. Redukcia proliferatívnej odpovede krvných lymfocytov k mitogénom (PHA a Con A) však bola zistená po experimentálnej BHV-1 infekcii (Griebel a i., 1987/88). U teliat premedikovaných glukánom a následne imunizovaných inaktivovanou olejovou IBR vakcínou (skupina GV) sme zaznamenali signifikantne

vyššiu úroveň oneskorenej kožnej precitlivosti tak oproti jej počiatkovej hodnote (pred imunizáciou), ako aj hodnote u kontrolných teliat. Na základe nami zvoleného metodického postupu oneskorenej kožnej precitlivosti (k indukcií použitý DNFB) nie je možné hodnotiť intenzitu bunečnej imunitnej odpovede z hľadiska špecificity k vírusu IBR. Aj napriek tomu však úroveň kožnej reakcie u obidvoch pokusných skupín teliat poukazuje, že po aplikácii nami použitej IBR vakcíny nedochádza k funkčnej redukcii v populácii T buniek. Stimuláciu oneskorenej kožnej precitlivosti pri teľatách skupiny GV je možno pripísať imunomodulačnému účinku aplikovaného glukánu. Pri teľatách takýto efekt fungálneho glukánu už bol zaznamenaný (P a u l í k a i., 1992a,b).

V obrane proti IBR dôležitú úlohu zohrávajú aj špecifické protilátky. Kým pri použití živých IBR vakcín dochádza k tvorbe špecifických sérových protilátok už po siedmom dni od imunizácie (G e r b e r a i., 1978), pri inaktivovaných IBR vakcínach k primárnej protilátkovej odpovedi v priebehu prvých dvoch týždňov buď nedochádza (Z a j a c a Ž u f f a, 1988), alebo sú protilátky v nízkych titroch zistené len u niektorých sledovaných zvierat (Ž u f f a a i., 1986; S t r a u b a M a w h i n n e y, 1988). V zhode s našim pozorovaním u teliat skupiny V G r a - n á t o v á a P š í k a l (1989) taktiež zaznamenali u určitého počtu (40 %) teliat primárnu IBR protilátkovú odpoveď až v 3. týždni po imunizácii. Aj napriek tomu, že pri živých IBR vakcínach je nástup protekcie časovo rýchlejší než pri IBR vakcínach inaktivovaných, niektoré nevýhodné vlastnosti (možný abort alebo infikovanie plodu, vznik latentnej infekcie s možnosťou exacerbácie) ich použitie za určitých podmienok limitujú (V a n D o n k e r s g o e d a B a b i u k, 1991). Týždenný predstih v započatí tvorby sérových anti-IBR protilátok u teliat skupiny GV (v porovnaní k teľatám len vakcinovaným) dáva predpoklad pre využitie glukánov k rýchlejšiemu navodeniu protilátkovej odpovede pri použití inaktivovanej olejovej IBR vakcíny.

Literatúra

- BENDA, V. - MÁDR, P.: Assessment of lymphocyte and phagocytic functions in goats treated with glucan. *J. veter. Med.*, 38, 1991, s. 681-684.
- BRIGGS, R. E. - KEHRLI, M. - FRANK, G. H.: Effects of infection with parainfluenza-3 virus and infectious bovine rhinotracheitis virus on neutrophil functions in calves. *Amer. J. veter. Res.*, 49, 1988, s. 682-686.
- COOK, C. G. - SPRLITTER, G. A.: Comparison of bovine mononuclear cells with other species for cytolytic activity against virally-infected cells. *Veter. Immunol. Immunopathol.*, 20, 1989, s. 239-261.
- FERENČÍK, M. - BERGENDI, L.: Vplyv glukánov na imunitný systém. In: Zbor. Konf. Glukány a iné umunomodulačné polysacharidy. Stará Lesná, DVP SAV 1990, s. 5-6.
- GERBER, J. D. - MARRON, A. E. - KUCERA, C. J.: Local and systemic cellular and antibody immune responses of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus vaccines administered intranasally or intramuscularly. *Amer. J. veter. Res.*, 39, 1978, s. 753-760.
- GRANÁTOVÁ, M. - PŠÍKAL, I.: Buňkami zprostředkovaná imunita u telat imunizovaných nebo infikovaných virem infekční bovinní rhinotracheitidy. *Veter. Med. (Praha)*, 34, 1989, s. 385-394.

- GRIEBEL, P. J. - QUALTIERE, L. - DAVIS, W. C. - GEE, A. - OHMANN, H. B. - LAWMAN, M. J. P. - BABIUK, L. A.: Lymphocyte population dynamics and function following a primary bovine herpesvirus type-1 infection. *Virol. Immunol.*, 1, 1987/88.
- KAHRS, R. F.: Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *J. Amer. veter. Med. Ass.*, 171, 1977, s. 1055-1064.
- PAULÍK, Š. - VRZGULA, L.: Možnosť použitia dinitrofluorovenzénu k preukázaniu bunečnej imunitnej odpovede u teliat. *Veter. Med. (Praha)*, 34, 1989, s. 321-328.
- PAULÍK, Š. - BAJOVÁ, V. - MOJŽISOVÁ, J.: Vplyv aplikácie nerozpustného fungálneho glukánu na úroveň oneskorenej kožnej precitlivelosti a fagocytárnu aktivitu krvných leukocytov u teliat. *Veter. Med. (Praha)*, 37, 1992a, s. 577-585.
- PAULÍK, Š. - ŠVRČEK, Š. - BENÍŠEK, Z. - HÚSKA, M. - ĐUROVE, A.: Využitie kožného testu pre hodnotenie aktuálnej úrovne celúlarnej imunity a jej úrovne po experimentálnej aplikácii glukánu a levamizolu u výkrmových býčkov. *Veter. Med. (Praha)*, 37, 1992b, s. 203-212.
- PÉREZ, H. A. - BOLIVAR, J. - BLAS, G. S.: The immunomodulatory effect of yeast glucan on delayed hypersensitivity. *J. Immunopharmacol.*, 6, 1984, s. 305-321.
- POLÁČEK, M.: Základy biometrie pre veterinárnych lekárov. Bratislava, Príroda 1984, 100 s.
- POSPÍŠIL, I.: Infekčná boviná rinotracheitída a infekčná pustulárna vulvovaginitída. In: SLANINA, L. a kol.: Zdravie a produkcia teliat. Bratislava, Príroda 1991, s. 277-280.
- REDDI, M. V. - RAJAN, A. - SULOCHANA, S.: Evaluation of the cell-mediated immune response in cattle induced by 2,4-dinitrochlorobenzene. *Veter. Immunol. Immunopathol.*, 2, 1981, s. 483-489.
- STRAUB, O. C. - MAWHINNEY, I. C.: Vaccination to protect calves against infectious bovine rhinotracheitis. *Veter. Rec.*, 122, 1988, s. 407-411.
- Van DONKERSGOED, J. - BABIUK, L. A.: Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. *Veter. Med.*, 1991, s. 86-94.
- WAGNEROVÁ, J. - LIŠKOVÁ, A. - ČERVENÁKOVÁ, L. - TRNOVEC, T. - FERENČÍK, M.: The immunoadjuvant effect of soluble glucan derivatives in mice. *Folia Microbiol.*, 36, 1991, s. 198-204.
- WHISTLER, R. L. - BUSHWAY, A. A. - SING, P. P.: Monocytotoxic antitumor polysaccharides. *Adv. carbohyd. Chem. Biochem.*, 31, 1976, s. 235-241.
- ZAJAC, J. - ŽUFFA, A.: Vyhodnotenie imunoenzymatickej reakcie pri kvantifikovaní protilátok proti vírusu infekčnej bovinnej rinotracheitídy. *Veter. Med. (Praha)*, 33, 1988, s. 643-650.
- ŽUFFA, A. - ZAJAC, J. - ŽUFFA, T.: Porovnanie imunizačnej účinnosti subjednotkovej a vírusovej inaktivovanej olejovej vakcíny proti infekčnej rinotracheitíde hovädzieho dobytku. *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986, s. 209-218.
- ŽUFFA, A. - BRÁNYIK, A. - ČERNÍK, K. - SALAJ, J.: Protection against experimental infection of calves vaccinated intranasally by three attenuated strains of IBR virus. *Zbl. Veter. - Med., R. B.*, 29, 1982, s. 413-425.

Došlo 11. 1. 1993

PAULÍK, Š. - BAJOVÁ, V. - BENKO, G. (University of Veterinary Medicine, Košice; State Veterinary Institute, Košice):

The level of delayed hypersensitivity and primary immune reaction after administration of inactivated oil IBR vaccine to glucan-premedicated calves.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (7) : 395-402.

The level of delayed skin hypersensitivity (DSH) to DNFB and of the primary immune reaction was evaluated in the calves immunized with an inactivated oil IBR vaccine

(V group) and in the calves premedicated with glucane (seven days before vaccine administration) and subsequently immunized with the mentioned vaccine (GV group). The DSH test did not reveal an alteration of cellular immunological reactivity in the calves immunized with an inactivated oil IBR vaccine; after the vaccine administration there was no significant difference in the DSH level from the value before vaccine administration nor in comparison with the value of control calves (K group), Tab. I. But in the immunized calves which were glucane-premedicated (from *Pleurotus ostreatus*; 10 mg/kg l.w.) a significantly higher DSH level was determined not only in comparison with the initial value ($P < 0.05$) before glucane administration but also with the value of control calves ($P < 0.05$), Tab. I. The categorization of calves according to the DSH level also points to the immunomodulating effect of glucane in this sense (Fig. 1); while the value of skin test ranged from 3.6 to 6.5 mm in the highest percentage of the calves of V and K groups on the dates before and after administration of the mentioned preparations, a marked increase (on the date after administration) in the number of calves (from 22 to 67 %) with the value of skin test higher than 6.5 mm was observed in the calves of GV group. The vaccine administration in itself (V group) did not induce the production of measurable amounts of serum IBR antibodies till day 14 after immunization.

In the glucane-premedicated calves (GV group) the primary immune reaction began to appear with a week advance, i.e. as soon as on day 7 after vaccination; in the second week the antibodies were demonstrated in 44 % of the examined calves with the average titre 1 : 6.2. In the third week of the experiment the serum antibodies were detected in 79 % of the calves of the V group (average titre 1 : 28.4) and in 67 % of the calves of the GV group (average titre 1 : 13.3); the mentioned difference in the serum antibody concentration was not statistically significant. Then the antibody titre was decreasing in both groups of calves reaching almost the same values in the 4th week after vaccination (V group = 1 : 3.5; GV group = 1 : 4.4), Fig. 2.

calf; delayed skin hypersensitivity; serum antibodies; glucane; vaccination; infectious bovine rhinotracheitis

Contact Address:

MVDr. Štefan Paľák, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73,
041 81 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 3211-15, fax 095 767675

ZÍSKAVANIE A ODCHOV GNOTOBIOTICKÝCH JAHNIAT A ICH VYUŽITIE VO VETERINÁRNEJ MEDICÍNE

A. Bomba¹, Ľ. Králiček¹, I. Koniarová¹, F. Lešník², J. Pošivák²,
V. Bučko², R. Žitňan³

¹Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice

²Experimentálne výskumné stredisko Univerzity veterinárskeho lekárstva
v Košiciach so sídlom v Zemplínskej Teplici

³Výskumný ústav živočíšnej výroby v Nitre, pracovisko Košice

V práci sme overili nami inovovanú metódu získavania gnotobiotických jahniat hysterektómiou, modifikované zariadenia pre odchov gnotobiotov, techniky ich odchovu a ošetrovania. Box pre vybavenie mláďat po hysterektómii oviec - hysterektomický box bol zhotovený z plexiskla a plne vyhovoval požiadavkám jednoduchej a rýchlej manipulácie. Nami modifikovaný izolátor pre odchov gnotobiotických jahniat zhotovený zo sklolaminátu s priezormi z plexiskla umožnil skupinový odchov. V porovnaní s izolátormi vybavenými izolátorovými vakmi z PVC fólie bol výrazne odolnejší proti mechanickému poškodeniu. Osvedčilo sa použitie zásobného izolátora pre krmivo a spotrebný materiál a izolátora na uskladnenie odpadového materiálu s izolátorovým vakom z PVC fólie, ktoré boli napojené spojovacím potrubím na odchovný izolátor. Ventilačný systém bol dostatočne účinný. Na hysterektómiu sme použili emaskulátor. Metóda je jednoduchá, rýchla, spoľahlivá a umožnila zachovať bahnice pre ďalšie experimentálne účely. Na kŕmenie gnotobiotických jahniat sme úspešne využili mliečnu kŕmnu zmes pre teľatá. V izolátore boli jahňatám odoberané vzorky biologického materiálu (krv, bachorová tekutina, trus). Sterilizácia izolátorov bola vykonaná 2% roztokom kyseliny peroctovej vo forme aerosolu. Mlieko, sklenený a kovový materiál boli autoklávované pri teplote 121 °C, tlaku 1,3 MPa po dobu 30 min a jadrová kŕmna zmes sa sterilizovala radiačne dávkou 2,5 Mrad. Všetky použité metódy sterilizácie boli plne účinné. Na mikrobiologickú kontrolu sme použili modifikovanú metódu, ktorá detekovala kontamináciu jahniat i izolátorov. Gnotobiotické jahňatá sa využívajú predovšetkým v oblasti štúdia vývoja a ovplyvňovania tráviacich procesov mláďat prežúvavcov z hľadiska stimulácie ich vývoja, prevencie a terapie tráviacich porúch, zvyšovania využiteľnosti krmiva a produkcie.

jahňatá; gnotobiológia; získavanie a odchov gnotobiotov; hysterektomický box; izolátor na odchov gnotobiotov

Gnotobioty sú zvieratá, u ktorých sú všetky živé formy známe a ich mikroflóra je definovaná a kontrolovaná tak po stránke kvalitatívnej, ako aj kvantitatívnej (Duškin a i., 1983; Coates a Gustafsson, 1984). Získavajú sa z bezmikróbných (germ-free, axenických) zvierat, ktorým sa inokulujú známe druhy

baktérií (D u c l u z e a u a R a i b a u d , 1989). Na získanie axenických zvierat sa používajú chirurgické metódy hysterektómia a hysterotómia (A l e x a n d e r a L y s o n s 1971; A l e x a n d e r a i . , 1973a), alebo sa po narodení vykoná dekontaminácia.

Pri uplatnení hysterektómie sa germ-free zvieratá získavajú v špeciálnych hysterektomických boxoch a odchováajú v izolátoroch v sterilných podmienkach (A l e x a n d e r a i . , 1973b; T r á v n i č e k a M a n d e l , 1979). Mlieko a pomôcky sa sterilizujú autoklavovaním, suché krmivo radiačne a vzduch prechádza cez mikrobiologické filtre. Izolátory sa sterilizujú kyselinou peroctovou. Mikrobiálna kontrola sa vykonáva podľa schémy W a g n e r a (1959) obvyčajne jedenkrát týždenne.

Výsledky viacerých autorov poukazujú na to, že vzájomné vzťahy medzi rôznymi druhmi baktérií prebiehajú v podmienkach *in vitro* inak ako u živého organizmu. Pre štúdium bakteriálnych interakcií ekosystému tráviaceho traktu a vzťahov medzi mikrofórou a makroorganizmom sú gnotobiotické zvieratá nevyhnutné. Z hľadiska exaktnosti a interpretovateľnosti výsledkov sú gnotobioty ideálnym experimentálnym modelom. Využíva ich mikrobiológia (F o n t y a i . , 1988), fyziológia (T r á v n i č e k a i . , 1975), infektológia (W i l s o n a i . , 1986; R o g e r s a i . , 1987), imunológia (H o w a r d a i . , 1986), farmakológia (K o c h , a i . , 1979), onkológia (E l - B a y o u m y a i . , 1983) a radiológia (M a n d e l a i . , 1980).

Cieľom našej práce bolo overiť našu inovovanú metódu získavania gnotobiotických jahniat, funkčnosť modifikovaného izolátora pre skupinový odchov gnotobiotov a zvládnuť techniku ich odchovu a odberu biologického materiálu v gnotobiotických podmienkach.

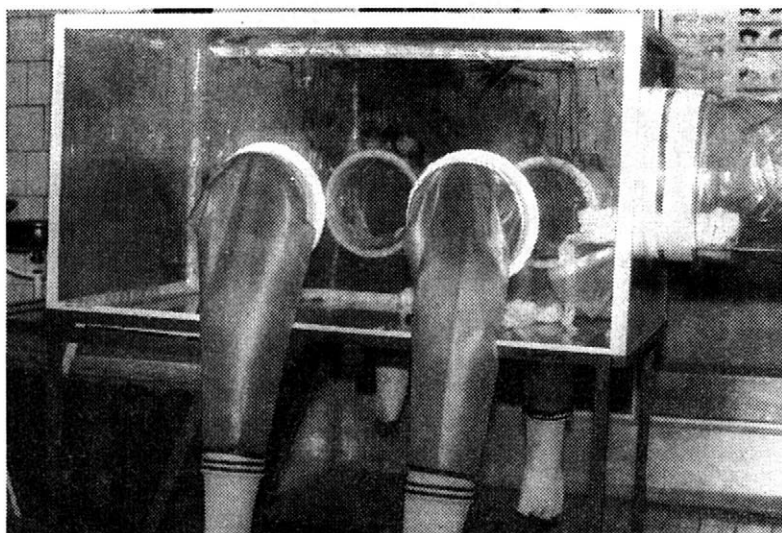
MATERIÁL A METÓDA

HYSTEREKTOMICKÝ BOX

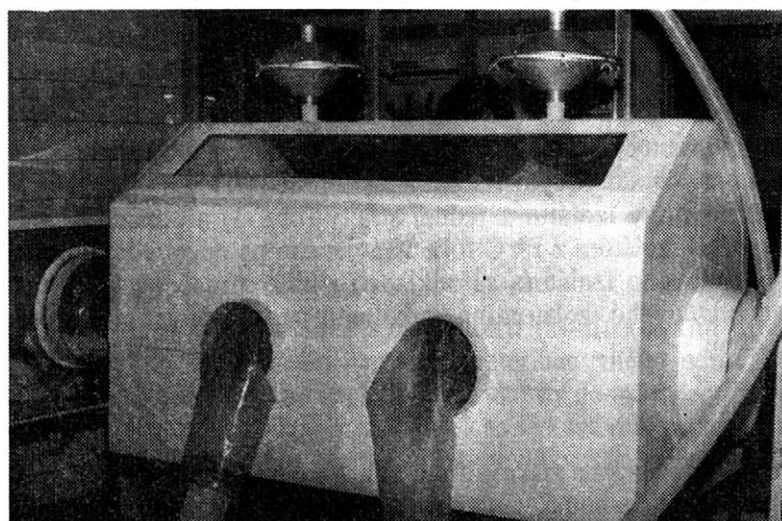
Hysterektomický box pre získavanie gnotobiotických jahniat bol zhotovený z plexiskla (obr. 1). Box má rozmery 110 x 60 x 55 cm. Mobilná kovová konštrukcia je osadená na kolieskach. Otvory pre rukávce sú situované po stranách boxu a prekladač na bočnej stene oproti prekladacej vani. Manipulačné rukavice z polychloroprénového kaučuku boli na plastikové rukávce pripevnené kovovými a gumennými krúžkami. Vnútny priemer otvorov pre rukávce je 19 cm a prekladača 30 cm. Prekladacia vaňa hysterektomického boxu sa plnila 5% chloramínom. Obsah vane je 100 l. V spodnej časti hysterektomického boxu bol otvor s výstupom pre nasunutie prekladacej vane.

IZOLÁTOR PRE ODCHOV GNOTOBIOTICKÝCH JAHNIAT

Laboratórium bolo spočiatku vybavené komerčne vyrábanými izolátormi (Isolator Program BEM, OPP Znojmo) z PVC fólie. Podľa nášho návrhu boli modifikované izolátory zo sklolaminátu s priezormi z plexiskla (obr. 2), ktoré použil T r á v n i č e k (osobné zdelenie) na odchov ciciakov. Odchovňový box má rozmery 140 x 72 x 79 cm. Priemer prekladača i otvorov pre rukávce je rovnakých rozme-

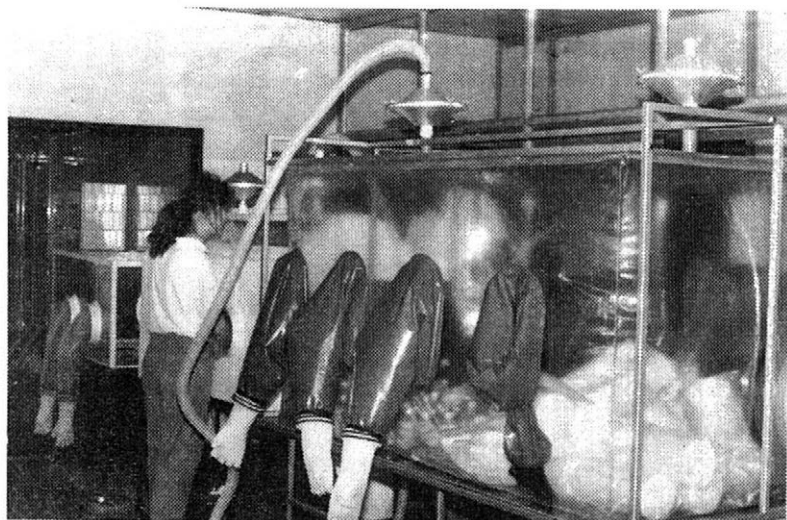


1. Box na vybavenie jahniat po hysterektómii – A hysterectomy hood



2. Izolátor na odchov gnotobiotických jahniat – An isolator for gnotobiotic lamb rearing

rov ako u hysterektomického boxu. Na podlahe boli umiestnené perforované dielce pre odtok moča, manipulačné otvory sú situované oproti sebe po stranách izolátora. Rukávce boli vyrobené z PVC fólie a rukavice z polychloroprénového kaučuku. Vý-



3. Zásobný izolátor pre krmivo a spotrebný materiál – An isolator for feed and material storage

mena vzduchu bola zabezpečená univerzálnym ventilátorom (pretlak 100 Pa, výmena vzduchu minimálne 10x za hodinu).

ZÁSObNÝ IzOLÁTOR A IzOLÁTOR NA ODKLADANIE ODPADU

Krmivo a spotrebný materiál sa do odchovňového izolátora prekladali zo zásobného izolátora s izolátorovým vakom z PVC fólie (OPP Znojmo), ktorý bol napojený na odchovňový izolátor z jednej strany (obr. 3) a odpadový materiál sa prekladal do iného izolátora z PVC fólie napojeného na odchovňový box z druhej strany. Do odpadového izolátora sa odkladali i fľaše s močom, ktorý sa odsával z podlahy odchovňového izolátora po nadvihnutí perforovaných dielcov pomocou janety s hadičkou.

HYSTEREKTÓMIA

Bezmikróbne jahňatá sme získavali modifikovanou metódou podľa K r á l i č e - k a (nepublikované). Samotná metóda hysterektómie bola overená na 15 bahniciach plemena merino a z tohto počtu zvierat bolo 7 jedincov použitých na získanie gnotobiotických jahniat. V jednom prípade boli získané dvojčatá. Hysterektómia sa vykonávala na 142. - 145. deň gravidity. U bahníc bola použitá injekčná anestézia: Rometar 2% inj. v dávke 0,15 - 0,25 ml/ž.h. s premedikáciou Atropín Spofa inj. ad usum vet. v dávke 1 ml *pro toto*. Medzi aplikáciou Rometaru a nástupom anestézie bola vykonaná príprava operačného poľa: ostrihanie, oholenie, odtučnenie benzín-alkoholom a dezinfekcia Rivanolom. Rez bol lokalizovaný v *linea alba*, kaudálne ohraničený mliečnou žľazou. Dĺžka rezu bola približne 20 cm. Po otvorení brušnej

dutiny bola maternica vyťahnutá, resekovaná emaskulátorom (Hauptner) a ihneď preložená cez dezinfekčnú vaňu do hysterektomického boxu. V boxe bolo jahňa okamžite vybavené, ošetrované, osušené a preložené cez spojovacie potrubie do odchovňového izolátora. Emaskulátor bol z pahýľa maternice ovce uvoľnený po 12 min od naloženia a bola vykonaná sutúra brušnej dutiny.

VÝŽIVA A OŠETROVANIE GNOTOBIOTICKÝCH JAHNIAT

Technológia odchovu bola overená na 4 jedincoch. Ďalšie 4 jahňatá uhynuli tesne po ich vybavení z maternice. Gnotobiotické jahňatá boli v izolátore odchovávané skupinovo (3 a po úhyne jedného jahňatá vo veku 10 dní 2 jedince) a jedno jahňa bolo odchovávané individuálne. Jahňatá boli napájané mliečnou krmnou zmesou Laktavit *ad libitum*. Prvý týždeň života dostávali mlieko 4x denne a od 2. týždňa veku do veku 5 týždňov 3x denne zo sklenenej fľašky s cumľom. Manipuláciu v izolátore vykonávali dvaja pracovníci cez otvory izolátora opatrené rukávcami a rukavicami. Ako podstielka bola použitá sterilná papierová vata, ktorá sa denne vymieňala. Od gnotobiotických jahniat bola odoberaná krv z v. *jugularis*, bachorová tekutina pažerákovou sondou a trus.

STERILIZÁCIA

Hysterektomický box a izolátor na odchov gnotobiotov sa dezinfikoval 2% roztokom kyseliny peroctovej pomocou rozprašovača. Kyselina peroctová sa nechala pôsobiť 24 h a potom sa izolátory prevetrávali pomocou ventilátorov. Mlieko sa autoklávovalo pri teplote 121 °C, tlaku 1,3 MPa po dobu 30 minút. Jadrová krmná zmes sa sterilizovala radiačne dávkou 2,5 Mrad. Sklenený a kovový materiál bol sterilizovaný autoklávom, papierová vata a gáza radiačne. Na filtráciu vzduchu boli použité dvojstupňové diskové filtre (prefilter FIRON VAF 1/KR a mikrobiologický filter AA).

MIKROBIOLOGICKÁ KONTROLA

Na mikrobiologickú kontrolu sme použili modifikovanú metódu podľa W a g n e r a (1959). Skúška sterility radiačne sterilizovaného jadrového krmiva sa nerobila. Po autoklávaní mlieka sa odoberali vzorky do mäsoseptónového bujónu a inkubovali sa. Testovanie sterility izolátorov sa vykonávalo po mechanickom vyčistení a sterilizácii. Tampóny so stermi sa inkubovali v mäsoseptónovom, VL a Sabouradovom bujóne. Po presune plodov do izolátora sa kontrolovala sterilita pri hysterektómii. Vzorky z plodových obalov, pupočníka a stery sa inkubovali v troch bujónoch. Pri odchove gnotobiotov sa vzorky odoberali 2x týždenne. Brali sa stery z rekta do mäsoseptónového bujónu na orientačné mikroskopické vyšetrenie, ster z povrchu tela do Sabouradovho bujónu a rektálna rúrka do VL bujónu inkubovaného anaeróbne. V tekutých pôdach sa vzorky inkubovali týždeň pri teplote 37 °C (Sabouradov bujón pri teplote 25 °C). Po inkubácii sa vysievali na rovnaký druh tuhej pôdy. Sterilita bola preukázaná ak aj po týždňovej inkubácii bol výsledok negatívny.

Nami modifikovaný box určený na vybavenie mláďat z maternice po hysterektómii oviec (obr. 1) vyhovoval svojmu účelu. Je podobnej konštrukcie ako hysterektomický box, ktorý použil Y o u n g a i. (1955) pre získanie SPF ciciakov a neskôr ho modifikovali pre získavanie germ-free ciciakov (M e y e r a i., 1963), jahniat (A l e x a n d e r a i., 1973a,b) a teliat (S w e a t a D u n n, 1965). Od týchto zariadení sa nami použitý hysterektomický box odlišoval tým, že prekladacia vaňa nebola konštrukčnou súčasťou boxu, ale sa nasúvala na spodnú prekladaciu časť hysterektomického boxu, ktorá bola ponorená do dezinfekčného roztoku. Druhou odlišnosťou bol strop, ktorý bol v našom prípade z rovnakého materiálu (plexisklo) ako celý box. V prípade uvádzaných autorov, bol strop hysterektomického boxu tvorený PVC fóliou, ktorá bola pripevnená k horným okrajom jeho obvodových stien. Rozmery vane i otvoru na dne hysterektomického boxu umožňovali potrebnú manipuláciu pri prekladaní maternice. Umiestnenie otvorov po stranách izolátora bolo z hľadiska obsiahnutia celého boxu zvolené vhodne. Nevýhodou boxu sa ukázalo to, že nebol vybavený vzdušnými filtrami, čo sťažovalo jeho priehľadnosť v dôsledku vyžrážania vlhkosti na jeho stenách pri vybavovaní jahniat.

Pre odchov gnotobiotických jahniat sme modifikovali sklolaminátový izolátor (obr. 2) používaný T r á v n i č k o m (osobné zdelenie) pre odchov ciciakov. Izolátor umožnil skupinový odchov jahniat. Jeho výhodou oproti izolátoru z PVC fólie, ktorý použili pre jahňatá A l e x a n d e r a L y s o n s (1971), je vyššia odolnosť proti mechanickému poškodeniu. Ďalšou prednosťou tohto modifikovaného izolátora je, že pre odchovávané jahňatá nie je potrebné používať špeciálne oceľové klietky zhotovené z dielcov menších rozmerov ako je priemer prekladača. Naproti tomu výhodou izolátorov s izolátorovým vakom z PVC fólie je ich priehľadnosť po celej ploche a ľahšia manipulácia s odchovávanými zvieratami. Použitý ventilačný systém bol dostatočne účinný.

Osvedčilo sa použitie zásobného izolátora pre krmivo a spotrebný materiál (obr. 3) i izolátora na ukladanie odpadového materiálu, ktorý bolo potrebné pravidelne vetrať, pretože v ňom stúpala vlhkosť z uloženého materiálu.

Naše metóda hysterektómie za použitia emaskulátora sa ukázala ako jednoduchá a spoľahlivá. Na rozdiel od iných autorov sme bahnice po hysterektómii neodporazili, ale po chirurgickom ošetrovaní slúžili na experimentálne účely, alebo boli po ochrannej lehote použitého anestetika (60 dní) odoslané na bežný bitúnok a mäso využívané na ľudský konzum. Po osvojení si nami modifikovanej metódy hysterektómie za použitia emaskulátora sa pri jej praktickej aplikácii nevyskytli u bahníc žiadne komplikácie. Pri kontrolnom odporazení dvoch bahníc 65 dní po zákroku sme u jednej z nich pozorovali na pahýle maternice nevstrebánu krvnú zrazeninu. Účinok anestézie matky na novorodené jahňatá nebol sledovaný. Na základe našich skúseností môžeme potvrdiť údaje A l e x a n d r a a L y s o n s a (1971), že získanie gnotobiotických jahniat má oproti ciciakom nevýhody v sezónnosti reprodukčného cyklu, malom počte získaných jahniat a v ich relatívne vysokej mortalite. V našej práci došlo k úhynu štyroch jahniat tesne po ich vybavení z maternice a jedno jahňa

uhynulo pri skupinovom odchove vo veku 10 dní v dôsledku výpadku ventilátora. Celková mortalita bola 62,5 %.

Na kŕmenie jahniat sme použili mliečnu kŕmnu zmes Laktavit určenú pre teľatá. A l e x a n d e r a i. (1973a) napájali gnotobiotické jahňatá zahusteným kravským mliekom. Ovčie mlieko obsahuje viac mliečného tuku a minerálie, ale jahňatá si ich nižší obsah v kravskom mlieku kompenzujú vyšším príjmom (R i o u a i., 1977). Na základe našich pozorovaní usudzujeme, že tejto kompenzácie sú jahňatá schopné v 2. - 3. týždni života. V 4. a 5. týždni života prijímalo gnotobiotické jahňa priemerne 1,6 l mliečnej kŕmnej zmesi na deň. Hmotnosť gnotobiotického jahňata, ktoré bolo kŕmené len mliekom dosiahla vo veku 5 týždňov 9,0 kg, čo predstavovalo 75 % konvenčného jahňata, ktoré okrem mlieka prijímalo aj jadrovú kŕmnu zmes a seno. Kŕmenie a ošetrovanie zvierat v izolátore z pevných stien, ktorý bol použitý v našich experimentoch je náročnejšie ako v izolátoroch z PVC fólie vybavených klietkou. Predovšetkým odbery vzoriek biologického materiálu (krv a bachorový obsah) si v sklolaminátovom izolátore vyžadujú zručnosť dvoch pracovníkov.

Všetky použité postupy sterilizácie izolátorov, krmiva, materiálu a vzduchu boli plne účinné. V súlade s odporúčeniami B a r r e t t a (1959) a G r e e n s p a n a a i. (1955) sme na sterilizáciu izolátorov použili roztok kyseliny peroctovej v 2% koncentrácii vo forme aerosolu a môžeme potvrdiť jeho spoľahlivú účinnosť.

Použitá modifikovaná metóda mikrobiologickej kontroly podľa W a g n e r a (1959) sa osvedčila. V prípade individuálneho odchovu došlo ku kontaminácii jahňata v gnotobiotickom izolátore s *Bacillus* spp. v 2. týždni života. Zdrojom kontaminácie bolo mlieko, ktoré nebolo dostatočne autoklavované v dôsledku poruchy autoklávu. Pri skupinovom odchove boli jahňatá germ-free 3 týždne. Ku kontaminácii došlo v 4. týždni ich života zárodkami *Staphylococcus hyicus* a *Bacillus cereus* v dôsledku prederavenia izolátorového vaku zásobného izolátora z PVC fólie.

Gnotobiotické jahňatá sa v našej experimentálnej práci využívajú predovšetkým v oblasti štúdia vývoja a ovplyvňovania tráviacich procesov mláďat prežúvavcov z hľadiska ich stimulácie, prevencie tráviacich porúch, zvyšovania využiteľnosti krmiva a produkcie.

PodĎakovanie

Autori práce vyjadrujú vďaku za technickú spoluprácu slečne J. K a r a f f o v e j a G. T i s c h l e r o v e j, pani Š. S e m a n ě i k o v e j, M. V a š i n s k e j a A. P i s k a j o v e j.

Literatúra

- ALEXANDER, T. J. L. - LYSONS, R. J.: Observations on rearing gnotobiotic lambs. Brit. veter. J., 127, 1971, s. 349-357.
- ALEXANDER, T. J. L. - LYSONS, R. J. - ELLIOTT, J. M. - WELLSTEAD, P. D.: Techniques for rearing gnotobiotic lambs. Lab. Anim., 7, 1973a, s. 239-254.
- ALEXANDER, T. J. L. - LYSONS, R. J. - ELLIOTT, J. M. - WELLSTEAD, P. D.: Equipment for rearing gnotobiotic lambs. Lab. Anim., 7, 1973b, s. 195-217.

- BARRET, J. P.: Sterilizing agents for Lobund flexible film apparatus. Proc. Anim. Care Panel, 9, 1959, s. 127-133.
- COATES, M. E. - GUSTAFSSON, B. E.: The germ-free animal in biomedical research. In: COATES, M. E. - GUSTAFSSON, B. E. (eds): Laboratory Animal Handbooks 9, Laboratory Animals LTD, London, 1984.
- DUCLUZEAU, R. - RAIBAUD, P.: Bacterial interactions within the digestive tract. Rev. sci. Tech. Off. int. Epiz., 8, 1989, s. 313-332.
- DUŠKIN, V. A. - INTIZAROV, M. M. - PETRAČEV, D. A. - PODOPRIGORA, G. I. - POPOV, V. I. - SOROKIN, V. V. - ŠIŠKOV, V. P.: Teoretičeskije a praktičeskije osnovy gnotobiologii. Moskva, Kolos 1983.
- EL-BAYOUMY, K. - SHARMA, C. - LOUIS, J. M. - REDDY, B. S. - HECHT, S. S.: The role of intestinal microflora in the metabolic reduction of 1-nitropyrene to 1-aminopyrene in germfree and conventional rats and in humans. Canc. Lett., 18, 1983, s. 311-316.
- FONTY, G. - GOUET, P. - RATEFIARIVELO, B. - JOUANY, J. P.: Establishment of *Bacteroides succinogenes* and measurement of the main digestive parameters in the rumen of gnotoxenic lambs. Can. J. Microbiol., 34, 1988, s. 938-946.
- GREENSPAN, F. P. - JOHNSEN, M. A. - TREXLER, P. C.: Paracetic acid aerosol. Proceedings of the Forty-Second Annual Meeting of the Chemical Specialties Manufacturers Association, 1955, s. 59-64.
- HOWARD, C. J. - PARSONS, K. R. - THOMAS, L. H.: Systemic and local immune responses of gnotobiotic calves to respiratory infection with *Mycoplasma bovis*. Veter. Immunol. Immunopath., 11, 1986, s. 291-300.
- KOCH, R. L. - CHRYSTAL, E. J. T. - BEAULIEU, B. B. J. - GOLDMAN, P.: Acetamide: a metabolite of metronidazole formed by the intestinal flora. Biochem. Pharmacol., 28, 1979, s. 3611-3615.
- MANDELL, L. - TREBICHAŤSKÝ, I. - MORÁVEK, F. - TRÁVNÍČEK, J.: Changes in the intestinal epithelial cells in abdominally irradiated germfree piglets. Strahlent., 156, 1980, s. 284-289.
- MEYER, R. C. - BOHL, E. H. - HENTHORNE, R. D. - THAEP, V. L. - BALDWIN, D. E.: The procurement and rearing of gnotobiotic swine. Lab. anim. carl., 13, 1963, s. 655-664.
- RIOU, J. - GOUET, P. - DUBOURGUIER, H. C. - CONTREPOIS, M. - DARDILLAT, C. - LEFGAIVRE, J.: Techniques for obtaining, fistulization and rearing of axenic or gnotoxenic lambs, kids and calves. Ann. Rech. vét., 8, 1977, s. 13-24.
- ROGERS, D. G. - CHEVILLE, N. F. - PUGH, G. W.: Pathogenesis of corneal lesions caused by *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. Veter. Path., 24, 1987, s. 287-295.
- SWEAT, R. L. - DUNN, J. W.: Hysterectomy-derived, colostrum-deprived, isolation raised calves for disease research. Amer. J. veter. Res., 26, 1965, s. 1309-1315.
- TRÁVNÍČEK, J. - KOVÁŘU, F. - MANDEL, L. - STOŽICKÝ, V. - KRUML, J.: The delivery of piglets for germfree rearing by Caesarean section in a closed system. Acta veter. (Brno), 44, 1975, s. 297-306.
- TRÁVNÍČEK, J. - MANDEL, L.: Gnotobiotic techniques. Folia Microbiol., 24, 1979, s. 5-11.
- WAGNER, M.: Determination of germ-free status. Ann. N. J. Acad. Sci., 78, 1959, s. 89-101.
- WILSON, K. H. - SHEAGREN, J. N. - FRETER, R. - WEWTERBEE, L. - LYERLY, D.: Gnotobiotic models for study of the microbial ecology of *Clostridium difficile* and *Escherichia coli*. J. infect. Diseases, 153, 1986, s. 547-551.
- YOUNG, G. A. - UNDERDAHL, N. R. - HINT, R. W.: Procurement of baby pigs by hysterectomy. Amer. J. veter. Res., 16, 1955, s. 123-131.

Došlo 24. 2. 1993

BOMBA, A. - KRÁLIČEK, L. - KONIAROVÁ, I. - LEŠNÍK, F. - POŠIVÁK, J. - BUČKO, V. - ŽITŇAN, R. (Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice; Zemplínska Teplica-based Experimental Research Centre of the University of Veterinary Medicine at Košice; Research Institute of Animal Nutrition, Nitra, Košice Station):

The recovery and rearing of gnotobiotic lambs and their use in veterinary medicine.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (7) : 403-411.

Our own innovated method of the hysterectomy recovery of gnotobiotic lambs, modified equipment for gnotobiotic rearing, management and tending techniques were tested in this study. A hysterectomy hood (Fig. 1) was made from plexiglass and it fully met the requirements for simple and rapid handling. Our own modified isolator for gnotobiotic lamb rearing (Fig. 2) made out of glass-reinforced plastic with plexiglass sight holes was used for group rearing. It was more resistant to mechanical damage in comparison with the isolators equipped with PVC sheet pouches. The use of an isolator for feed and material (Fig. 3) and of an isolator for waste material storage with a PVC sheet pouch was found to be very practical; these isolators were connected to the rearing isolator through piping. The ventilation system was sufficient enough. An emasculator was used for hysterectomy. The method is simple and rapid, reliable and it enabled to preserve lambing ewes for other experimental purposes. Gnotobiotic lambs were successfully fed a milk replacer for calves. Samples of biological material (blood, rumen fluid, droppings) were taken from lambs kept in the isolator. The isolators were sterilized with 2% solution of peracetic acid sprayed as aerosol. Milk, materials made of glass and metal were autoclaved at a temperature of 121 °C, pressure 1.2 atm, for 30 minutes, and the concentrate mixture was sterilized with an X-ray dose of 2.5 Mrad. All the used methods of sterilization were fully efficient. A modified method reliably detecting lamb and isolator contamination was used for microbiological monitoring. Gnotobiotic lambs are employed to study mainly the development of and effects on the digestive activities of ruminant young with respect to their stimulation, prevention and therapy of digestive disorders, to an improvement of feed utilization and production.

lambs; gnotobiology; recovery and rearing of gnotobiotics; hysterectomy hood; isolator for gnotobiotic rearing

Contact Address:

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

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 8/1993 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny tyto příspěvky:

Tančin V., Harcek E., Brouček J., Uhrinčat M., Mihina S.: Zmeny hladiny oxytocínu a kortizolu u prvôstok po prechode z 21dňového cicania teľatami na strojové dojenie

Slanina E., Nagy O., Šedovič M., Kaderiak J.: Experimentálna paroxyzmálna hemoglobínúria teliat a jej dosah na hematologický a acidobázický profil

Šedovič M., Nagy O., Slanina E.: Experimentálna paroxyzmálna hemoglobínúria teliat a vybrané biochemické ukazovatele v krvi a moči

Paulík Š., Bajová V., Levkutová M., Benko G., Harvan M.: Efekt primárnej BHV-1 infekcie na dynamiku T a B lymfocytov periférnej krvi a hladinu špecifických sérových protilátok u teliat ošetrovaných glukánom

Skřivanová V., Šimůnek J., Marounek M., Kuboušková M.: Vliv přísavky AMP-50 na užitkovost, vybrané hematologické a biochemické parametry a stravitelnost živin u telat v mléčném výkrmu

Hanuš O., Ponížil A., Kopecký J., Gabriel B., Jedelská R.: Dynamika změn polohy kalibrační přímky při stanovení počtu somatických buněk přístrojem Fossomatic za různých hladin diskriminace ve vzorcích kravského mléka syrového a pasterovaného

Juriš P., Plachý P., Dubinský P., Venglovský J., Tóth F.: Vplyv aeróbnej stabilizácie tekutých exkrementov ošípaných v laboratórnych podmienkach na vitalitu zárodkov *Salmonella typhimurium* a *Ascaris suum*

VPLYV RASTLINNEJ VÝŽIVY NA NIEKTORÉ HODNOTY METABOLIZMU BIELKOVÍN A TUKOV U POTKANOV V RÔZKOM VEKU

M. Krajčovičová-Kudláčková, E. Ozdín

Výskumný ústav výživy, Bratislava

Potkanom (samcom) vo veku 30 - 140 dní sa podávala potrava s optimálnym obsahom živín diferencovane podľa veku, so zdrojom bielkovín: kazeín mlieka, sója (odtučnená a zbavená inhibítorov tráviacich enzýmov), pšeničný glutén a ich zmes (po 1/3 bielkovín). Miera proteosyntézy, sledovaná na základe inkorporácie L-/U-¹⁴C/-tyrozínu v bielkovinovej frakcii pečene a svalu zvierat na výžive kazeín-glutén, je vyrovnaná pre oba druhy bielkovín u zvierat vo veku 140 dní, u rastúcich zvierat (70 dní) sú hodnoty aminokyseliny významne nižšie pre výživu gluténom. Zistila sa priama závislosť využitia bielkovín (čistý proteínový pomer NPR) na hodnotách aminokyselinového skóre limitujúcich aminokyselín a potenciálnej biologickej hodnote potravy u rastúcich zvierat vo veku 30 - 98 dní. V dospelosti (od 105 dní) je využitia rastlinných zdrojov potravy vyrovnaná so živočíšnym zdrojom a teda nezávislá na kvalite aminogramov. Výsledky ukazujú na neplnohodnotnosť rastlinných zdrojov potravy z hľadiska proteosyntézy a obsahu limitujúcich aminokyselín (určujúcich pre syntézu peptidových reťazcov) v období vývoja organizmu. Hodnoty cholesterolu a triacylglycerolov v sére potkanov sú nižšie pre rastlinnú a zmiešanú výživu a vykazujú priamy vzťah ku Lys/Arg a Met potravy a nepriamy ku Arg+Glu+Gly.

potkany; rastlinná výživa; kvalita bielkovín; proteosyntéza; čistý proteínový pomer

Pre fyziologický priebeh metabolických procesov organizmu musí potrava obsahovať všetky živiny a v každom veku v určitom správnom pomere (FAO/WHO/UNU, 1985; NRC, 1978). S vekom sa mení pomer medzi novotvorbou telových bielkovín a bielkovín pre obnovu tkanív (K r a j č o v i č o v á - K u d l á č k o v á a D i b á k , 1986).

V práci je sledovaný vplyv rastlinných zdrojov potravy rôznej kvality (sója, pšeničný glutén) a ich zmesi s kazeínom v podmienkach optimálneho príjmu živín na ich využiteľnosť z hľadiska aminokyselín a proteosyntézy (čistý proteínový pomer NPR) u laboratórnych potkanov v rôznom veku. Izotopovou štúdiou na základe inkorporácie značkovanej aminokyseliny v bielkovinovej frakcii pečene a svalu zvierat na referenčnej výžive (kazeín) a rastlinnej výžive (glutén) je sledovaná miera proteosyntézy vzhľadom na vek. Výsledky sú doplnené o priebeh procesu glukoneogenézy a hodnoty triacylglycerolov a cholesterolu. Zdroje výživy sú hodnotené okrem bežne užívaného posúdenia kvality bielkovín tiež podľa limitujúcich aminokyselín a podľa potenciálnej biologickej hodnoty (M i t c h e l l , 1964; Č e r n í k o v , 1986).

MATERIÁL A METÓDY

Pokus sme robili na potkanoch, samcoch (kmeň Wistar; chovná stanica Velaz, Praha) hneď po odstavení (hmotnosť 68 ± 5 g), ktorým sme do veku 140 dní podávali *ad libitum* potravu optimálneho zloženia živín diferencovane podľa postupujúceho veku, ako sme zistili prv v našich experimentoch (K r a j č o v i č o v á - K u d l á č k o v á, 1990). Ako rastlinný zdroj výživy sme použili odtučnenú sójovú múku (Čokoládovny, Praha; Sója, Kolín), pečenú pri teplote 180°C 20 min na odstránenie inhibítorov tráviacich enzýmov (F r i e d m a n a i., 1989) o obsahu 46 ± 3 % bielkovín, $1,7 \pm 0,2$ % tukov a $37,0 \pm 2,8$ % sacharidov, ďalej pšeničný glutén (Slovenské škrobárne, Trnava) o obsahu 70 ± 2 % bielkovín, $6,0 \pm 0,4$ % tukov a $12,0 \pm 1,0$ % sacharidov. Zmiešanú (rastlinno-živočišnu) potravu tvorila zmes dvoch rastlinných zdrojov s kazeínom mlieka v rovnakých množstvách v dávke bielkovín. Živočišny zdroj (Laktos, Praha) mal zloženie 78 ± 2 % bielkovín, $1,3 \pm 0,06$ % tukov a $2,0 \pm 0,09$ % sacharidov. Obsah tukov a sacharidov prinesený s potrebnou dávkou bielkovín príslušného zdroja bol odpočítaný od margarínu (Palma, Bratislava), ktorý má pomer nasýtených ku nenasýteným mastným kyselinám 1 : 4 a od pšeničného škrobu v zložení experimentálnych diét. Zložky sacharidov boli sacharóza a pšeničný škrob vo fyziologickom pomere 1 : 6,2 (K r a j č o v i č o v á - K u d l á č k o v á, 1992). Na stanovenie obsahu aminokyselín v zdrojoch rastlinnej výživy a v kazeíne boli zdroje hydrolyzované v asi 40-násobku HCl ($c = 6$ mol/l) po dobu 72 h a v hydrolyzovaných vzorkách bol obsah aminokyselín stanovený zautomatizovanou chromatografickou metódou (S p a c k m a n a i., 1958).

Výpočet obsahu optimálnej dávky bielkovín rastlinných zdrojov (bez fortifikácie aminokyselin a vzhľadom na referenčný živočišny zdroj kazeín), je uvedený v tab. I.

Zostavenie potravy s fyziologickým obsahom živín:

zložky potravy (g/100 g)	vek potkanov (dni)				
	30 - 45	46 - 75	76 - 90	91 - 120	121 - 146
tuky	30	20	15	11	10
sacharidy	36	41	46	51	51
soľná zmes Osborne	4	4	4	4	4
bielkoviny					
kazeín K	15	15	12,5	11,5	10
agar	15	20	22,5	22,5	25
sója S	16,8	16,8	14	12,9	11,2
agar	13,2	18,2	21	21,1	23,8
glutén G	21,9	21,9	18,3	16,8	14,6
agar	8,1	13,1	16,7	17,2	20,4
zmes M (KSG)					
0,33 : 0,34 : 0,34	17,9	17,9	14,9	13,7	11,9
agar	12,1	17,1	20,1	20,3	23,1

Vitamínová zmes sa pridávala do potravy pred jej každodenným podaním zvieratám (H e n r y , 1965).

Obsah dusíka resp. bielkovín (N x 6,25) v kazeíne, sóji, gluténe a v potrave bol stanovený Dumasovou metódou (V o n d e n h o f a S c h u l t e , 1979). Obsah tukov v zdrojoch potravín, v margaríne a diétach sme určili extrakčnou metódou Soxhletovou a obsah sacharidov v zdrojoch bielkovín, v sacharóze, pšeničnom škrobe a v potrave sme stanovili metódou podľa Schoorla (P r í b e l a , 1978). Obsah živín v potrave sa pohyboval v rozmedzí prípustných hraníc (chyba 0,3 - 0,6 %).

Zvieratá v počte 72 ks na kazeínovej potrave, 16 ks na sóji, 32 ks na gluténe a 16 ks na zmesi troch zdrojov bielkovín boli umiestnené v kliebkach s mriežkovou podlahou individuálne. Potravu a pitnú vodu dostávali *ad libitum*. Smernice pre starostlivosť o laboratórne zvieratá boli dodržiavané. Denne sme merali spotrebu potravy a týždenne hmotnosť zvierat. Z kazeínovej skupiny sa postupne vyčlenilo 5 skupín zvierat po 8 ks na konzumáciu bezbielkovinovej potravy po dobu 7 dní, aby sa zistil priemerný úbytok hmotnosti pre výpočet NPR (B e n d e r a D o e l l , 1957) a to vo veku 35 - 42 dní, 63 - 70 dní, 85 - 91 dní, 113 - 119 dní a 133 - 140 dní, teda na začiatku experimentu, ďalej v čase 1. a 2. dekapitácie a naviac ešte po jednom raze v období dospievania a v dospelosti.

$$\text{NPR} = \frac{\text{prirastok hmotnosti zvierat} + \text{úbytok hmotnosti zvierat}}{\text{na testovanom proteíne (g)} \quad \text{na bezbielkovinovej potrave (g)}} \\ \text{príjem bielkovín (g)}$$

Na 70. a 140. deň sa 8 ks každej skupiny podľa druhu potravy dekapitovalo (následne po 16hodinovom hladovaní), bola odobratá krv na stanovenie triacylglycerolov a cholesterolu v sére, ďalej rýchlo vypitvaná pečeň, schladená a navážaná na stanovenie aktivity fosfoenolpyruvátcarboxykinázy - PEPCK (E.C.4.1.1.32) - F l o r e s a A l l e y n e (1971). Zložky lipidov boli merané testami firmy Lachema.

Ďalej na 70. a 140. deň veku sa po 8 ks zvierat na kazeínovej potrave na gluténovej potrave (najnižšie NPR do 70 dní veku) použilo na izotopovú štúdiu (T a n a k a a i ., 1987) Od 7.30 do 16.30 h zvieratá hladovali, od 16.30 do 19.30 h mali voľný prístup k potrave. Príjem vody nebol obmedzovaný. O 19.30 h sa potkanom aplikoval intraperitoneálne L-/U-¹⁴C/-tyrozín (sterilizovaný, 2% etanolickej roztok s mernou aktivitou 13.32 GBq/mmol, riedený na aplikovanú dávku vytemperovaným fyziologickým roztokom) v množstve 2,9 mg/g hmotnosti u mladých zvierat a 2 mg/g hmotnosti u starších potkanov (T a n a k a a i ., 1987). 12 hodín po aplikácii izotopu boli zvieratá usmrtené éterovou narkózou, bola vypitvaná pečeň a odobratá vzorka z pravého zadného stehnového svalu. Z pečene a svalu sa navážilo asi 250 mg do 20 dielov zmesi chloroform-metanol (2 : 1) podľa autorov (F o l c h a i . (1957). Po 24.hodinovej extrakcii a následnej centrifugácii (10 min, 5 000 ot/min) sa sediment spracovával s 20 dielmi 10% kyseliny trichloroctovej na získanie čistej proteínovej frakcie z použitých tkanív. Po bežnej centrifugácii bol sediment po vyzrážaní bielkovín rozpustený inkubáciou pri 50 °C v NCS (Nuclear

Chicago Solubilizer, US Patent 3, 506 828). Z rozpustenej proteínovej frakcie bol odobratý 1 ml do scintilačnej banky, okyslenej 50 - 100 μ l ľadovej kyseliny octovej (na odstránenie chemiluminiscencie), ďalej bolo pridané 10 ml PCS (Phase Combining System) a po úplnom odstránení fluorescence roztoku bol rádioaktívny uhlík detekovaný kvapalno-scintilačnou spektrometriou metódou externého štandardu za riadením LKB typ 1214 Rack Beta Excel (Švédsko).

Na stanovenie obsahu tyrozínu v tkanivách v čase dekapitácie bola pečeň a sval hydrolyzovaná s kyselinou chlorovodíkovou ($c = 6$ mol/l, asi 40-násobkom) po dobu 72 h a v hydrolyzátoch tkanív bol obsah tyrozínu stanovený chromatografickou metódou (S p a c k m a n a i., 1958).

VÝSLEDKY

V tab. I sú uvedené aminogramy kazeínu, sóje a gluténu a výpočet optimálnej dávky bielkovín vzhľadom ku kazeínu (bez fortifikácie aminokyselin) na základe priemernej hodnoty pomeru aminokyselín kazeín/rastlinný zdroj a bez limitujúcich aminokyselín. Faktorom 1,12 pre sóju a 1,46 pre glutén boli násobené optimálne hodnoty kazeínu v experimentálnych diétach a tieto potom v zmesi bielkovín kazeín-sója- glutén úmerne redukované na jednu tretinu. Pomer esenciálnych ku neesenciálnym aminokyselinám je pre kazeín 0,79, pre sóju 0,73 a pre glutén 0,30. Aminokyselinové skóre sumy esenciálnych aminokyselín EAS vzhľadom ku kazeínu je u sóje 93, pre glutén 53.

Tab. II obsahuje hodnoty aminokyselín v optimálnych množstvách bielkovín rastlinných zdrojov (a ich zmesi s kazeínom) úmerných 1 g bielkovín kazeínu podľa výpočtu v tab. I. EAS sa tým zvýšilo pre sóju na 104, pre glutén na 77 a zmes takto upravených dvoch rastlinných bielkovín s kazeínom má EAS 94. Aminokyselinové skóre rastlinných bielkovín, s kazeínom má EAS 94. Aminokyselinové skóre AS limitujúcej aminokyseliny pre kazeín (Met+Cys/2) vzhľadom na vajce má hodnotu 67, pre sóju (Met+Cys/2) 63, pre glutén (Lys) 28 a zmes bielkovín (Met+Cys/2) 67. Priemerná hodnota rozdielov aminokyselinového skóre RAS 8 esenciálnych aminokyselín (+Cys/2, +Tyr) vzhľadom na limitujúcu aminokyselinu v každom zdroji bielkovín KRAS má pre K hodnotu 30, pre S 34,9, pre G 45,9 a pre M najnižšiu hodnotu 23. 100-KRAS, teda potenciálna (teoretická) biologická hodnota BH_p je najvyššia pre zmes bielkovín (77), po nej nižšiu, ale blízku hodnotu má kazeín (70), nasleduje sója (65,1) a najnižšiu BH_p má glutén (54,1).

Tab. III a obr. 1 ukazujú priebeh hmotnosti zvierat vo veku 30 - 140 dní v týždenných intervaloch pre použité druhy potravy. Charakteristický priebeh má krivka hmotnosti pre živočíšny referenčný zdroj kazeín. Hmotnosť stúpa s vekom lineárne do obdobia 77 dní, čo vo vyjadrení regresnej priamky ($y = 6,9987x - 133,6814$; $n = 110$; $r = 0,9982$; $P < 0,001$) znamená denný nárast hmotnosti 6,99 g a obdobie prudkého rastu potkanov. Záver rastovej krivky od 105 dní veku možno tiež považovať za lineárny ($y = 0,6408x + 412,0020$; $n = 48$; $r = 0,9459$; $P < 0,001$) s nárastom hmotnosti len 640 mg. Toto obdobie s veľmi nízkou zmenou hmotnosti je už obdobie dospelosti. Vyrovnané s kazeínom sú hodnoty hmotnosti zvierat na

I. Hodnoty aminokyselín (mg/g bielkovín) v kazeíne (K), sóji (S), gluténe (G), pomer aminokyselín K/S a K/G a úprava hodnôt aminokyselín pre optimálnu dávku bielkovín, pomer esenciálnych ku neesenciálnym aminokyselinám E/N a aminokyselinové skóre sumy esenciálnych aminokyselín EAS – The values of amino acids (mg/g proteins) in casein (k), soya (S), gluten (G), amino acid ratios in K/s and K/G, and adjustment of amino acid values for an optimum protein rate, essential to non-essential amino acid ratio E/N and the amino acid score of the sum of essential amino acids EAS

Amino-kyselina ¹ (n = 6)	K	S	K/S	S x 1,12	K/S x 1,12	G	K/G	G x 1,46	K/G x 1,46
His	28 ± 1	25 ± 1	1,12	28	1,00	15 ± 1	1,86	22	1,27
Ile	44 ± 3	54 ± 2	0,81	61	0,72	33 ± 3	1,27	48	0,88
Leu	107 ± 4	85 ± 3	1,26	95	1,12	71 ± 3	1,51	104	1,02
Lys	81 ± 3	72 ± 2	1,12	81	1,00	12 ± 1	6,75	18	4,50
Met	29 ± 1	17 ± 1				12 ± 1	2,41	18	1,61
Cys/2	7 ± 1	13 ± 1	1,20	34	1,06	13 ± 1	0,53	19	0,37
Phe	56 ± 2	56 ± 1	1,00	63	0,89	44 ± 3	1,27	64	0,88
Thr	36 ± 3	48 ± 1	0,71	54	0,67	18 ± 1	1,89	26	1,31
Val	65 ± 3	55 ± 1	1,18	62	1,05	30 ± 2	2,16	44	1,48
Arg	35 ± 2	71 ± 2	0,48	80	0,43	31 ± 2	1,13	45	0,78
Glu	190 ± 7	191 ± 10	1,00	214	0,89	478 ± 33	0,40	698	0,27
Pro	120 ± 5	49 ± 2	2,45	55	2,18	124 ± 8	0,97	181	0,67
Ser	51 ± 3	41 ± 3	1,25	46	1,10	38 ± 3	1,34	55	0,93
Tyr	64 ± 4	23 ± 1	2,78	26	2,46	26 ± 2	2,46	38	1,68
Ala	26 ± 1	37 ± 1	0,70	41	0,63	23 ± 1	1,13	34	0,76
Asp	62 ± 4	98 ± 6	0,63	110	0,56	24 ± 1	2,58	35	1,77
Gly	15 ± 1	40 ± 2	0,34	45	0,33	29 ± 2	0,52	42	0,36
			1,12		1,00		1,46 (-Lys)		1,00
E/N	446/570 = 0,79	412/563 = 0,73				235/786 = 0,30			
EAS	100	93				53			

¹ amino acid

II. Hodnoty aminokyselin v 1 g kazeinu (K), v množstvách rastlinných zdrojov odpovedajúcich podľa kvality 1 g kazeinu (1,12 g bielkovín sóje S, 1,46 g bielkovín gluténu G a 1,19 g bielkovín ich zmesi M), pomer esenciálnych ku neesenciálnym aminokyselinám E/N, aminokyselinové skóre jednotlivých esenciálnych aminokyselin AS_x a ich sumy EAS, rozdiel aminokyselinového skóre RAS, koeficient rozdielov aminokyselinového skóre KRAS a potenciálna biologická hodnota BH_p – The values of amino acids per 1 g casein (K), as the amounts of vegetable sources corresponding by the quality to 1 g casein (1.12 g soya S proteins, 1.46 g gluten G proteins and 1.19 proteins of their mixture M), essential to nonessential amino acid ratio E/N, amino acid score of particular essential amino acids AS_x and of their sum EAS, difference in the amino acid score RAS, coefficient of the differences in the amino acid score KRAS and the potential biological values BH_p

Amino-kyselina ¹	Vajce ² (FAO/WHO/ UNU, 1985)	K			S			G			M		
		mg 1 g	AS_x	RAS	mg 1,12 g	AS_x	RAS	mg 1,46 g	AS_x	RAS	mg 1,19 g	AS_x	RAS
His	24	28	116	49	28	116	53	22	92	64	26	108	41
Ile	66	44	67	0	61	92	29	48	73	45	51	77	10
Leu	88	107	121	54	95	108	45	104	117	89	102	116	49
Lys	64	81	127	60	81	126	63	18	28	0	61	95	28
Met	31	29			19			18			22		
Cys/2	23	7	67	0	15	63	0	19	69	41	14	67	0
Phe	58	56			63			64			61		
Tyr	43	64	119	52	26	88	25	38	101	73	43	103	36
Thr	51	36	71	4	54	106	43	26	51	23	39	77	10
Val	74	65	88	21	62	84	21	44	60	32	57	77	10
KRAS				30,0			34,9			45,9			23,0
BH_p				70,0			65,1			54,1			77,0
Arg		35			80			45			54		
Glu		190			214			693			364		
Pro		120			55			180			119		
Ser		51			46			55			51		
Ala		26			41			33			34		
Asp		62			110			35			70		
Gly		15			45			42			34		
E/N		446/570 = 0,79			463/632 = 0,73			344/1140 = 0,30			419/783 = 0,54		
EAS		100			104			77			94		

¹amino acid, ²egg

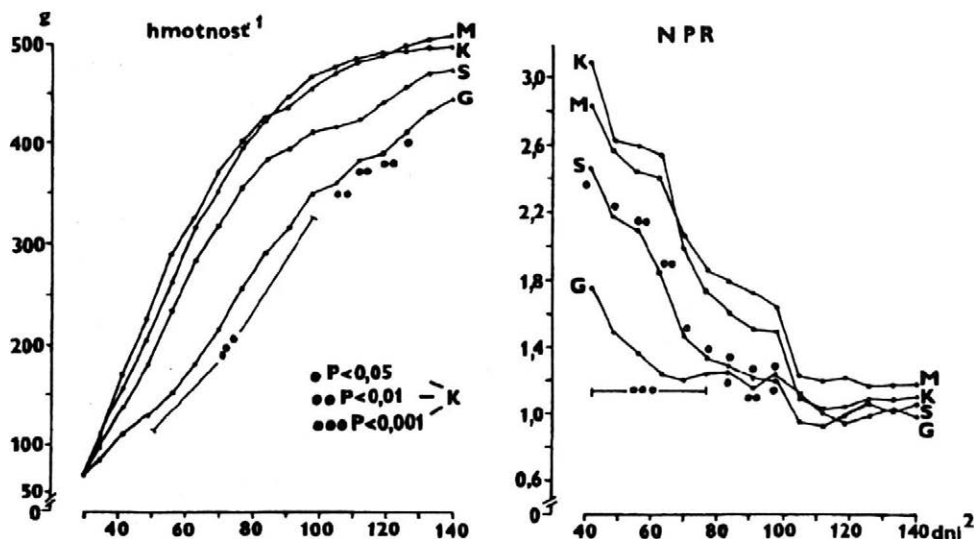
III. Hmotnosť zvierat (g) a čistý proteínový pomer NPR za dlhodobého príjmu potravy optimálneho zloženia živín diferencovaných podľa postupujúceho veku a zdrojom bielkovín kazeín (K), sója (S), glutén (G) a ich zmes (M), obsahujúca po 1/3 z každého druhu. P = oproti kazeínu, * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$ – The weight of rats (g) and net protein ratio NPR under a long-range intake of a diet with optimum formula differentiated in dependence on age and with casein (K), soya (S), gluten (G) and their mixture (M) containing one-third portions of each protein, as protein sources. P = against casein, * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$

Vek (dni) ¹	K	S	G	M
35	115 ± 5	100 ± 12	88 ± 6*	102 ± 7
42	160 ± 8	140 ± 8	111 ± 16**	172 ± 10
49	208 ± 8	183 ± 10	133 ± 12***	233 ± 13
56	265 ± 12	238 ± 13	155 ± 14***	291 ± 8
63	318 ± 10	298 ± 13	186 ± 19***	339 ± 10
70	354 ± 13	321 ± 17	221 ± 18***	376 ± 11
77	396 ± 12	358 ± 15	359 ± 11***	403 ± 17
84	424 ± 16	358 ± 22	294 ± 12***	425 ± 13
91	449 ± 20	397 ± 24	320 ± 14***	438 ± 18
98	468 ± 7	413 ± 30	352 ± 12***	455 ± 20
105	478 ± 28	416 ± 23	362 ± 23**	467 ± 24
112	481 ± 16	429 ± 29	386 ± 20**	480 ± 17
119	493 ± 25	443 ± 20	393 ± 13**	492 ± 16
126	495 ± 22	458 ± 24	416 ± 19*	498 ± 20
133	496 ± 21	472 ± 29	434 ± 18	505 ± 19
140	500 ± 33	474 ± 30	449 ± 20	509 ± 23
42	3,10 ± 0,15	2,48 ± 0,17*	1,78 ± 0,17***	2,83 ± 0,14
49	2,64 ± 0,14	2,18 ± 0,16*	1,50 ± 0,12***	2,58 ± 0,16
56	2,61 ± 0,09	2,10 ± 0,15**	1,38 ± 0,11***	2,46 ± 0,15
63	2,56 ± 0,18	1,86 ± 0,12**	1,25 ± 0,14***	2,43 ± 0,14
70	2,00 ± 0,15	1,48 ± 0,10*	1,22 ± 0,13***	2,07 ± 0,11
77	1,75 ± 0,08	1,35 ± 0,14*	1,26 ± 0,08***	1,88 ± 0,10
84	1,62 ± 0,09	1,30 ± 0,09*	1,27 ± 0,12*	1,80 ± 0,09
91	1,52 ± 0,06	1,23 ± 0,08*	1,17 ± 0,10**	1,74 ± 0,06
98	1,51 ± 0,08	1,22 ± 0,10*	1,26 ± 0,10*	1,65 ± 0,06
105	1,10 ± 0,11	0,96 ± 0,06	1,12 ± 0,08	1,24 ± 0,04
112	1,04 ± 0,12	0,94 ± 0,06	1,01 ± 0,06	1,20 ± 0,05
119	1,06 ± 0,13	1,01 ± 0,08	0,96 ± 0,07	1,23 ± 0,03
126	1,11 ± 0,07	1,09 ± 0,09	1,00 ± 0,05	1,19 ± 0,04
133	1,10 ± 0,08	1,02 ± 0,08	1,04 ± 0,04	1,19 ± 0,05
140	1,12 ± 0,05	1,07 ± 0,10	0,99 ± 0,04	1,20 ± 0,04

¹ age (days)

zmesi M. Znížené hodnoty, no nevýznamne, má rastová krivka zvierat na sóji a atypický priebeh má hmotnosť zvierat s vekom na obilovine. Hodnoty hmotnosti u G zvierat sú v celej vekovej škále významne nižšie vzhľadom na kazeín, u posledných dvoch meraní je zníženie hmotnosti nevýznamné.

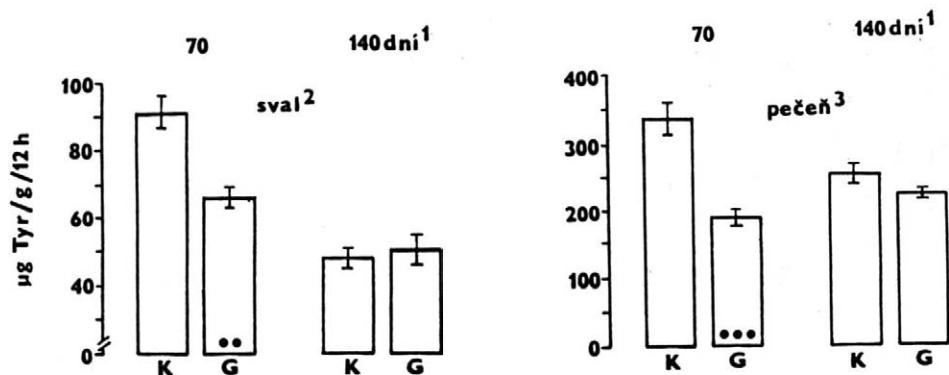
Utilizácia bielkovín (tab. III, obr. 1) je pre zmes bielkovín nevýznamne nižšia oproti kazeínu vo veku 42 - 70 dní, od 77 dní veku až do konca pokusu hodnoty NPR zmesi prevyšujú hodnoty pre kazeín. Nižšie oproti kazeínu (na hranici významnosti) je NPR pre sóju do veku 98 dní (pre vek 56 a 63 dní je $P < 0,01$). Významné zníženie dosahuje NPR u gluténu: do veku 77 dní 43 - 51 %, do veku 98 dní je zníženie využitia obilnej bielkoviny o 17 - 24 %. Od 105 dní veku sú zmeny v NPR pre všetky použité druhy bielkovín nevýznamné.



1. Hmotnosť zvierat a čistý proteínový pomer NPR za dlhodobého príjmu (od odstavu do veku 140 dní) potravy optimálneho zloženia živín diferencovaným podľa postupujúceho veku a zdrojom bielkovín kazeín (K), sója (S), glutén (G) a ich zmes (M) obsahujúca po 1/3 z každého druhu bielkoviny. Stredné chyby priemeru sú uvedené v tab. III - The weight of rats and net protein ratio NPR under a long-range intake (from weaning to the age of 140 days) of a diet with optimum formula differentiated in dependence on age and with casein (K), soya (S), gluten (G) and their mixture (M) containing one-third portions of each protein, as protein sources. Tab. III shows standard errors of the mean

¹weight, ²days

Na obr. 2 sú výsledky izotopovej štúdie. Množstvo tyrozínu pre proteosyntézu u potkanov dlhodobo na potrave kazeínovej a gluténovej je vypočítané z celkového množstva aminokyseliny v pečeni a svalu po kyslej hydrolýze bielkovín a na základe podielu rádioaktivity z celkovej podanej dávky izotopu v bielkovinovej frakcii pečene a svalu za 12 hodín. Je významne vyššie v pečeni a svalu u mladých zvierat vo veku 70 dní (teda v období prudkého rastu) pre kazeínovú potravu. Vo svalu je



2. Množstvo tyrozínu použité za 12 hodín na proteosyntézu vo svaloch a pečeni zvierat veku 70 a 140 dní, dlhodobo na potrave optimálneho zloženia živín a zdrojom bielkovín kazeín (K) a glutén (G) – Tyrosine amounts utilized in 12 hours for proteosynthesis in the muscles and liver of rats at the age of 70 and 140 days, receiving for a long time a diet with optimum formula and with casein (K) and gluten (G) as protein sources

¹days, ²muscle, ³liver

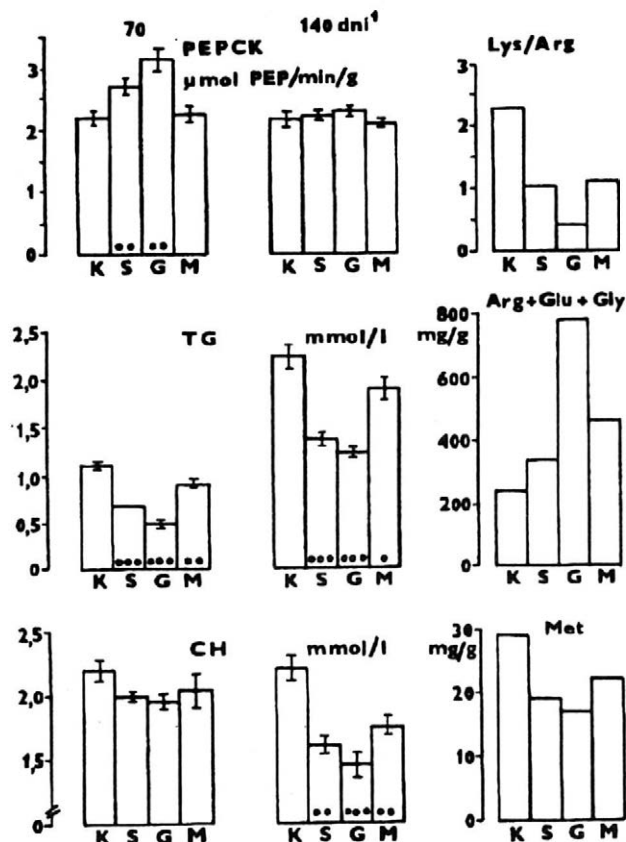
zvýšenie 1,4násobné, v pečeni 1,7násobné. Pre sval zvierat dospelých (veku 140 dní) sú hodnoty tyrozínu pre proteosyntézu vyrovnané pre kazeín a glutén, v pečeni je zníženie pre gluténovú potravu nevýznamné.

Hodnoty aktivity fosfoenolpyruvátcarboxykinázy PEPCK (obr. 3) v pečeni zvierat vo veku 70 dní sú v nepriamom vzťahu k hodnotám NPR pri vzájomnom porovnaní použitých druhov potravy. Pre vek 140 dní je proces glukoneogenézy vyrovnaný pre K, S, G a M.

Sérové hodnoty triacylglycerolov (TG) a cholesterolu (CH) sú významne nižšie oproti kazeínu pre všetky druhy potravy a pre obe vekové kategórie s výnimkou nevýznamného zníženia cholesterolu pre vek 70 dní (obr. 3). Najväčšie zníženie hodnôt TG a CH je u potravy s obilnou bielkovinou a sójovou bielkovinou. Priebeh lipidických parametrov séra v rade K, S, G, M je v priamej závislosti na priebehu hodnôt Lys/Arg a Met a v nepriamom pomere k súčtu Arg+Glu+Gly (obr. 3).

DISKUSIA

Pre posúdenie využiteľnosti zdrojov potravy pre organizmus z hľadiska bielkovín sú významné závery práce autorky Mitchell (1964) a nové hodnotenie bielkovín podľa koeficientu rozdielov aminokyselinového skóre a potenciálnej biologickej hodnoty (Černíkov, 1986). Definícia kvality bielkovín v zmysle zastúpenia všetkých esenciálnych aminokyselín a ich rovnováhy k neesenciálnym (poměr E/N blízky číslu jeden), ako sú v referenčnej bielkovine slepačieho vajca alebo kravského mlieka (FAO/WHO/UNU, 1985) ovšem platí v súčinnosti s obsahom limitujúcej aminokyseliny, resp. jej aminokyselinového skóre vzhľadom na referenčný proteín. Prvá deficitná (limitujúca) aminokyselina určuje stupeň produktívneho využitia (na plastické, anabolické pochody) ostatných esenciálnych aminokyselín, pretože je iniciátorom syntézy peptidového reťazca. Je známy prísny predpis sekvencie jednotlivých



3. Aktivita fosfoenolpyruvátcarboxykinázy PEPCK v pečeni, hodnoty triacylglycerolov (TG) a cholesterolu (CH) v sére zvierat veku 70 a 140 dní dlhodobo na potrave optimálneho zloženia živín a zdrojom bielkovín kazeín (K), sója (S), glutén (G) a ich zmes (M). Hodnoty Lys/Arg, Arg+Glu+Gly a Met v potrave zvierat – The activity of phosphoenolpyruvatecarboxykinase PEPCK in liver, the values of triacylglycerol (TG) and cholesterol (CH) concentrations in the blood serum of rats at the age of 70 and 140 days receiving for a long time a diet with optimum formula and with casein (K), soya (S), gluten (G) and their mixture (M) as protein sources. Dietary values of Lys/Arg, Arg+Glu+Gly and Met in rats

¹days

vých aminokyselín v primárnej štruktúre syntezovaných bielkovín daný tripletmi nukleotidov v genetickom kóde. Podľa ponuky množstva limitujúcej aminokyseliny sa radia do peptidového reťazca ostatné aminokyseliny.

Černíkov (1986) berie do úvahy pri posudzovaní kvality bielkovín, resp. výpočtu hodnoty pre proteosyntézu priemer rozdielov aminokyselinového skóre jednotlivých esenciálnych aminokyselín oproti vajcu vzhľadom na limitujúce aminokyseliny v hodnotených zdrojoch bielkovín (KRAS), čo je zbytok esenciálnych aminokyselín, ktorý sa nevyužije na plastické potreby organizmu a využíva sa na katabolické pochody bielkovín. Čím je nižšia hodnota KRAS, tým je bielkovina kvalitnejšia. 100-KRAS je potenciálna biologická hodnota BH_p a znamená stupeň produktívneho využitia esenciálnych aminokyselín na proteosyntézu.

Kvalita bielkovín v spojitosti s utilizáciou bielkovín viedla v predkladanej práci k týmto záverom pre zvieratá prudko rastúce. Čím je vyššie skóre limitujúcej aminokyseliny a čím je vyššia hodnota BH_p, tým je bielkovina, resp. zmes aminokyselín lepšie utilizovateľná: AS limitujúcich aminokyselín v rade K, S, G, M je 67, 63, 28, 67; BH_p 70,0; 65,1; 54,1; 77,0; NPR pre vek 70 dní 2,00; 1,48 ($P < 0,05$); 1,22 ($P < 0,001$); 2,07; pre vek 98 dní (obdobie dospievania) 1,51; 1,22 ($P < 0,05$); 1,26 ($P < 0,05$); 1,65. V dospelosti sa rozdiely v kvalite bielkovín neodrážajú na ich uti-

lizácii. Utilizácia aminokyselín použitých zdrojov rastlinnej výživy je vyrovnaná so živočíšnym zdrojom, resp. nevýznamne zmenená oproti zmiešanému typu výživy (NPR pre M je od veku 70 dní až do 140 dní najvyššie). Na proteosyntézu, ktorá v dospelosti po ukončení rastu, znamená obnovu tkanív, údržbu organizmu, stačia hodnoty limitujúcich aminokyselín v daných aminogramoch.

Potvrďuje to aj izotopová štúdia zistenia miery proteosyntézy na základe inkorporácie značkovanej aminokyseliny v bielkovinovej frakcii pečene a svalu potkanov prudko rastúcich a dospelých, v ktorej sem vo veku 140 dní nenašli rozdiely v hodnote aminokyseliny pre proteosyntézu za časovú jednotku u výživy rastlinnej (glutén) v porovnaní s kazeínom. Naopak u veku 70 dní došlo k významnému zníženiu miery proteosyntézy u rastlinnej výživy. Zníženú intenzitu proteosyntézy v dospelosti dokumentujú nižšie hodnoty tyrozínu pre proteosyntézu oproti veku 70 dní na referenčnom proteíne.

Hodnotenie vzťahu využitia a kvality bielkovín sa odráža aj v priebehu kriviek hmotnosti pre jednotlivé zdroje výživy a v opačnom vzťahu v údajoch hodnotí aktivity enzýmu glukoneogenézy v období rastu, ktorý proces poukazuje na katabolické pochody bielkovín. Navyše vychádza priama závislosť v rade použitých zdrojov K, S, G, M medzi aktivitou glukoneogenézy a hodnotami KRAS.

Nízke hodnoty triacylglycerolov a cholesterolu pri konzumácii rastlinnej stravy sú známe. V našej práci v podmienkach optimálneho obsahu živín treba uvažovať o vplyve meniacej sa zložky na lipidické parametre a tou sú aminokyseliny. K r i t c h e v k y a i., (1982) vyslovili domnienku o ovplyvňovaní hodnôt sérového cholesterolu v priamom smere pomerom Lys/Arg. D o u c e t a i. (1987) nenašli súvislosť medzi obsahom Lys v potrave a hodnotami sérového cholesterolu. H u f f a C a r r o l l (1980) zistili negatívnu koreláciu hodnôt triglyceridémie a cholesterolémie s obsahom súčtu Arg+Glu+Gly v potrave. Y a g a s a k i a i. (1986) popísali, že vyšší obsah Met spôsobil hypercholesterolémiu u potkanov a morčiat. Uviedli tiež negatívnu koreláciu medzi koncentráciou Arg v potrave a hodnotami cholesterolu. Popísané vzťahy lipidických parametrov a aminokyselín sme ukázali aj v našej práci (Lys/Arg, Met, Arg+Glu+Gly a hodnoty cholesterolu a triacylglycerolov).

ZÁVER

V dlhodobom experimente na potkanoch veku 30 - 140 dní sa sledoval vplyv rastlinnej výživy (sója, glutén), resp. zmiešanej výživy (zmes sója, glutén, kazeín) na využitia bielkovín, mieru proteosyntézy a hodnoty lipidických parametrov a to v podmienkach optimálneho zloženia potravy. Zistila sa priama závislosť využitia bielkovín (NPR) u rastúcich potkanov (30 - 98 dní) na hodnotách aminokyselinového skóre limitujúcich aminokyselín a potenciálnej biologickej hodnote použitých aminogramov. Izotopovou technikou sa našla nižšia miera proteosyntézy zvierat veku 70 dní na gluténe v porovnaní s kazeínom. V dospelosti (105 - 140 dní) je využitia bielkovín pre všetky druhy potravy vyrovnaná, takisto miera proteosyntézy pre potravu kazeínovú aj gluténovú. Je znížená intenzita proteosyntézy (už nie novotvorba bielkovín, ale len obnova tkanív, údržby organizmu). Znížené sú sérové hodnoty cholesterolu a triacylglycerolov zvierat na rastlinnej a zmiešanej strave oproti kazeínu a sú v priamej korelácii k Met a Lys/Arg potravy a v nepriamom vzťahu k Arg+Glu+Gly.

Literatúra

- BENDER, A. E. - DOELL, B. H.: Biological evaluation of proteins, a new aspect. *Brit. J. Nutr.*, 11, 1957, s. 140-148.
- ČERNÍKOV, M. P.: K voprosu o racionalnoj klassifikacii piščevych belkov. *Vop. Pitan.*, 55, 1986, s. 68-70.
- DOUCET, C. - FLAMENT, C. - SAUTIER, C. - LEMONIER, D.: Effect of an hypercholesterolemic diet on the level of several serum lipids and lipoproteins in nine rat strains. *Reprod. Nutr. Dev.*, 27, 1987, s. 897-903.
- FAO/WHO/UNU: Energy and protein requirements, Rep. joint FAO/WHO/UNU Meeting. Geneva, WHO 1985.
- FLORES, H. - ALLEYNE, G. A. O.: Phosphoenolpyruvate carboxykinase in kidney. *Biochem. J.*, 123, 1971, s. 35-39.
- FOLCH, J. - LEES, M. - SLOANE-STENLEY, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. biol. Chem.*, 226, 1957, s. 497-509.
- FRIEDMAN, M. - GUMBMANN, M. R. - BRANDON, D. L. - BATES, A. H.: Inactivation and analysis of soybean inhibitors of digestive enzymes. In: KINSELLA, J.: *Foods proteins*. Am. Oil. Chemists Soc., Urbana, 1989, s. 296-328.
- HENRY, K. M.: A comparison of biological methods with rats for determining the nutritive value of proteins. *Brit. J. Nutr.* 19, 1965, s. 125-135.
- HUFF, M. W. - CARROLL, K. K.: Effect of dietary protein on turnover, oxidation and absorption of cholesterol and on steroid excretion in rabbits. *J. Lip. Res.*, 21, 1980, s. 546-558.
- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M.: Veková závislosť využitia bielkovín na príjme tukov rôznej kvality. *Veter. Med. (Praha)*, 35, 1990, s. 365-372.
- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M.: Age dependence of protein utilization of different quality in animal experiments. *Physiol. Res.*, 41, 1992, s. 243-249.
- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M. - DIBÁK, O.: The relationship between protein retention and energy requirements in rats of different ages. *Physiol. behomoslav.*, 35, 1986, s. 243-250.
- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M. - FECENKOVÁ, E.: Rastlinné bielkoviny vo výžive, ich hodnotenie vzhľadom na vek u potkanov. *Potr. Vědy*, 9, 1991, s. 133-141.
- KRITCHEVSKY, D. - TEPPER, S. A. - CZARNECKI, S. K. - KLURFELD, D. M.: Atherogenicity of animal and vegetable protein. *Atheroscl.*, 41, 1982, s. 429-431.
- MITCHELL, H. H.: *Comparative nutrition of man and domestic animals*. New York, Academic Press 1964. 595 s.
- National research council (NRC): *Nutrient requirement of laboratory animals*. Washington, National Academy of Sciences 1978. 77 s.
- PRÍBELA, A.: *Analýza prírodných látok v potravine*. Bratislava, Alfa 1978, 430 s.
- SPACKMAN, D. H. - STEIN, W. H. - MOORE, S.: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analyt. Chem.*, 30, 1958, s. 1190-1206.
- TANAKA, H. - NAKATOMI, Y. - OGURA, M.: Metabolism of phenylalanine, tyrosine and aspartic acid in growing rats at various dietary protein levels. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1987, s. 499-505.
- VONDENHOF, T. - SCHULTE, K.: Bestimmung des Stickstoffs bei Fleischerzeugnissen nach dem Kjeldhal- und Dumas-Verfahren. *Dtsch. Lebensm. Rdsch.*, 75, 1979, s. 187-189.
- YAGASAKI, K. - OSHAWA, N. - FUNABIKI, R.: Effect of dietary amino acids on, and role of thyroid hormone in, methionine-induced endogenous hypercholesterolemia. *Nutr. Res. Int.*, 33, 1986, s. 321-328.

Došlo 5. 3. 1993

Male len rats at the age of 30 - 140 days were administered a diet with an optimum content of nutrients in dependence on their age in which the source of proteins was this: milk casein (essential acid to nonessential acid ratio E/N = 0.79), soya (defatted and without inhibitors of digestive enzymes, E/N = 0.73), wheat gluten (E/N = 0.30), and their mixture (with one-third portions of each protein, E/N = 0.54). The dietary protein values were adjusted to optimum values according to the quality with respect to casein (without amino acid fortification). Protein utilization (net protein ratio NPR) was determined in weekly intervals, triacylglycerol and cholesterol concentrations in the blood serum were determined on the 70th and 140th day of age. A proteosynthesis rate was determined isotopically as L-/U-¹⁴C/-tyrosine incorporation in the protein fractions of liver and muscle in 12 hours after intraperitoneal application of the isotope in the rats in the period of rapid growth and in the adult rats on a casein - gluten diet. The isotopically determined values of tyrosine in the liver and muscles are significantly lower for the age of 70 days and gluten diet in comparison with the casein values. The proteosynthesis rate at the age of 140 days is identical. A direct relation was also found between protein utilization and the values of the amino acid score of limiting amino acids AS and the potential biological value of the diet BH_p in growing rats at the age of 30 - 98 days (AS - K/Met + Cys/2/67, S/Met + Cys/2/63, G/Lys/28, mixture /Met+Cys/2/ 67; BH_p - K 70.0; S 65.1; G 54.1; mixture 77.0; NPR /70 days/ - K 2.00; S 1.48; G 1.22; mixture 2.07). In adult rats (from the age of 105 days) the utilization of the diet from vegetable sources is equalized with the utilization of the diet from animal sources, hence it does not depend on the aminogram quality. The results demonstrate the unsufficiency of vegetable sources of food with respect to proteosynthesis and the content of limiting amino acids (decisive for the synthesis of peptide chains) in the period of the organism development. In adult rats the values of the aminograms of food vegetable sources are sufficiently high with respect to the lower rate of proteosynthesis (not for the growth but for the organism maintenance, tissue regeneration). The values of cholesterol and triacylglycerol concentrations in the blood serum of len rats are lower for vegetable and mixed diets in comparison with dietary casein, and they are in direct proportion to the dietary Lys/Arg and Met ratio and in indirect proportion to the Arg+Glu+Gly sum.

growing and adult len rats; vegetable diet; protein quality; proteosynthesis rate; net protein ratio

Contact Address:

Ing. Marica K r a j č o v i č o v á - K u d l á č k o v á, CSc., Výskumný ústav výživy,
Limbová 14, 833 37 Bratislava, Slovak Republic
Tel. 07 373560, fax 07 373968

Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, Praha 2

pro Vás v letošním roce připravil novou publikaci,
která by neměla chybět ve Vaší odborné knihovně:

TERMINOLOGICKÝ SLOVNÍK

CHOV PRASAT

Slovník obsahuje přes 1800 termínů v českém jazyce s překladem do slovenštiny, němčiny, angličtiny, ruštiny, částečně i latiny a s českou definicí termínů.

Slovník je další z řady terminologických slovníků a oceníte jej zejména při práci s odborným textem v uvedených jazycích. Pro snadnou orientaci jsou připojeny rejstříky ve všech jmenovaných jazycích.

Cena slovníku je 43,- Kč.

Objednávky posílejte na adresu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
pí. Hrnčířová
Slezská 7

120 56 Praha 2

PŘECHOD RADIOCESIA DO KRÁLÍČÍHO MASA A JEHO EXKRECE

J. Jandl, K. Sladovník

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

Je popsán přechod radiocesia do králíčího masa po ingesci sena přirozeně kontaminovaného následkem havárie v Černobyli. Bylo zjištěno, že po 20 dnech se ustaví rovnováha mezi příjmem radionuklidu a jeho koncentrací v maso králíků. Hodnota přechodového koeficientu je 0,29 d/kg. Exkrece radiocesia po převedení zvířat na nekontaminovanou potravu odpovídá dvěma biologickým poločasům: $T_{b1} = 1,5$ dne a $T_{b2} = 66$ dnů. Ze změřených hodnot je sestavena retenční rovnice Cs-137 v králíčím maso, kterou lze využít pro výpočet množství radiocesia v různých dobách po ukončení ingesce kontaminovaného krmiva.

králíčí maso; radiocesium; přechodový koeficient; biologický poločas; Černobyl

Jak známo, po černobylské havárii bylo území našeho státu zasaženo radioaktivním spadem, z něhož po vymizení krátkodobých radionuklidů (hlavně I-131) zůstalo přítomno v životním prostředí především radiocesium, izotop Cs-137 a Cs-134, z nichž zvláště první představuje (a podle prognóz ještě dlouho představovat bude) hrozbu pro potravní řetězec půda - rostlina (krmivo) - zvíře - člověk. Pohyb radionuklidu řetězcem je ovlivňován mnoha fyzikálně-chemickými i biologickými veličinami, jejichž výslednicí je přechodový koeficient T_f mezi danými články řetězce. Vylučování (úbytek) radionuklidu z organismu se nejčastěji popisuje biologickým (nebo efektivním) poločasem a retenční rovnicí.

V posledních letech bylo provedeno mnoho studií přechodu radiocesia do organismu hospodářských zvířat i jeho vylučování (Assimakopoulos aj., 1987; Voight aj., 1988, 1989; Howard, 1989; Ward aj., 1989). V literatuře však chybí podobné experimenty provedené s králíky. Přitom je chov králíků u nás velmi rozšířen. Cílem této práce proto bylo:

- využít krmiva (sena) přirozeně kontaminovaného radiocesiem ke sledování retence radiocesia v maso králíků
- z výsledků vypočítat přechodový koeficient krmivo - zvíře (králíčí maso)
- po převedení zvířat na nekontaminovanou dietu sledovat exkrece radiocesia a vypočítat biologické poločasy
- pro praktické využití vypočítat retenční křivku, ze které lze stanovit dobu potřebnou ke snížení množství radiocesia na požadovanou hodnotu.

MATERIÁL A METODY

Pokusy byly provedeny s 20 králíky (kalifornské plemeno, samice). Průměrná hmotnost svaloviny byla 1,9 kg. 16 králíků bylo (kromě dalších komponent) krmeno senem sklizeným v okolí Velkého Meziříčí v rámci monitoringu kontaminace území po černobylské havárii. Pro pokus bylo vzato seno z jediné plochy, vzhledem ke zjištěné nehomogenní kontaminaci trávy i v rozmezí 500 - 1000 m. Kontaminace sena byla způsobena převážně Cs-137, což bylo prokázáno spektrometricky. V době pokusů byl poměr aktivity Cs-137 k aktivitě Cs-134 cca 8 : 1. Denní dávka sena činila 0,5 kg, průměrná měrná aktivita sena byla $2\,294 \pm 345$ Bq/kg. Čtyři králíci tvořili kontrolní skupinu.

Po 20 dnech od počátku ingesce (která byla kontrolována vizuálně) se ustavila přibližná rovnováha mezi příjmem a vylučováním cesia. Králíci byli proto převedeni na normální dietu - směs pro výkrm králíků.

Ve stanovených intervalech byl náhodně vybraný kus utracen a ze hřbetní a stehenní svaloviny byly připraveny tři vzorky masa v 250 ml PE lahvích. Dále byla změřena radioaktivita Cs-137 v masě a stanoven nárůst a pokles množství radiocesie.

Veškerá měření radioaktivity se prováděla polovodičovým germaniovým detektorem s vyhodnocením na mnohakanálovém analyzátoru impulzů Canberra Series 80 (P r o c h á z k a , aj., 1987)

KUMULACE Cs-137

Přechodový koeficient T_f je definován vztahem:

$$T_f = \frac{\text{aktivita Cs-137 v masě (Bq/kg)}}{\text{denní příjem Cs-137 (Bq/d)}} = (d/kg) \quad (1)$$

Denní příjem = koncentrace Cs-137 v krmivu (Bq/kg) násobený denním příjmem krmiva (kg/d). Rovnice (1) je platná jen v případě rovnovážného stavu mezi příjmem a exkrecí radionuklidu.

EXKRECE Cs-137

Celková rychlost, s níž se radioaktivita ve sledovaném organismu (nebo jeho části) zmenšuje, je obecně dána fyzikálním poločasem radionuklidu T a fyziologickou eliminací charakterizovanou biologickým poločasem T_b (J a n d l a P e t r , 1988). Celkový pokles pak vyjadřuje efektivní poločas T_{ef} definovaný rovnicí:

$$\frac{1}{T_{ef}} = \frac{1}{T} + \frac{1}{T_b} \quad (2)$$

U Cs-137 je T natolik dlouhý (30.17 roků), že při trvání experimentu asi 40 dní lze člen $1/T$ v rovnici (2) zanedbat, jinými slovy pokles aktivity je dán pouze fyziologickou eliminací, tedy biologickým poločasem T_b , který odpovídá poločasu efektivnímu (J a n d l aj., 1991).

Úbytek radioaktivity v čase t lze vyjádřit retenční rovnicí:

$$A_t = I_1 \cdot e^{-\lambda_{b1} \cdot t} + I_2 \cdot e^{-\lambda_{b2} \cdot t} + \dots + I_i \cdot e^{-\lambda_{bi} \cdot t} \quad (3)$$

kde: A_t - aktivita v čase t ,

$I_1, \dots, I_i$ - jsou konstanty odpovídající úsekům, pro které platí jistý T_b

$\lambda_{b1}, \dots, \lambda_{bi}$ - jsou konstanty biologického úbytku (d), které jsou s biologickým poločasem spojeny vztahem:

$$\lambda_b = \frac{\ln 2}{T_b} \quad (4)$$

Rovnice (3) má tolik členů, kolikrát se během exkrece radionuklidu změni biologický poločas.

Hodnoty T_b , I a počet členů v rovnici (3) jsme pro naše měření zjistili z retenční křivky, která je na obr. 1. Hodnoty λ_b jsou vypočteny podle (4). Z výsledků je sestavena retenční rovnice (6) pro úbytek aktivity Cs-137 v králíčím mase.

VÝSLEDKY A DISKUSE

KUMULACE CS-137 V MASE

V tab. I jsou uvedeny hodnoty měrných aktivit králíčího masa (Bq/kg) v době 2 až 24 dnů od první ingesce kontaminovaného krmiva. Uvedena je průměrná hodnota ze tří vzorků a směrodatná odchylka S .

Měrná aktivita svaloviny kontrolních králíků byla během celého pokusu rovna $11,6 \pm 2$ Bq/kg.

Ze změřených hodnot (tab. I) je vidět, že kolem 20. dne po zahájení krmení dochází prakticky k rovnovážné koncentraci radiocesia v mase. Toto zjištění nám umožnilo

I. Nárůst aktivity Cs-137 v králíčím mase. Aritmetický průměr měrných aktivit A (Bq/kg) ze tří vzorků a směrodatná odchylka S – An increase in the Cs-137 activity in rabbit's meat. The arithmetical mean of specific activities A (Bq/kg) calculated from three samples and standard deviation S

Doba krmení (dny) ¹	A [Bq/kg]	S
2	56,2	1,6
3	63,4	0,7
7	125,5	2,8
10	181,3	11,3
13	277,0	4,2
17	330,8	21,9
20	333,4	3,5
24	335,9	7,0

¹feeding time (days)

použit hodnotu měrné aktivity z 24. dne pro výpočet přechodového koeficientu krmivo (seno) maso, podle rovnice (1), kam dále dosadíme denní příjem radiocesia:

$$T_f = \frac{335,9}{2 \cdot 294 \cdot 0,5} = 0,29 \pm 0,15 \quad (\text{d/kg}) \quad (5)$$

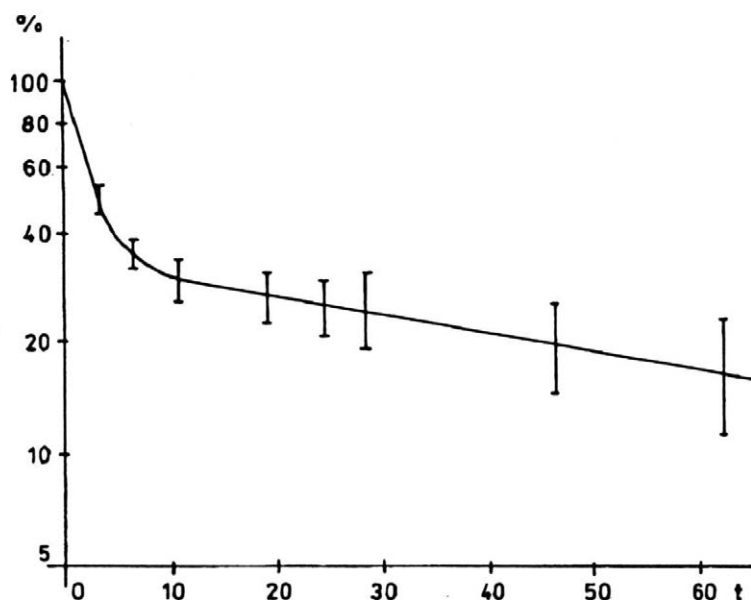
Vypočtená číselná hodnota T_f vyjadřuje část denního příjmu radionuklidu, která se nachází v 1 kg králíčho masa. Hodnota $T_f \approx 0,3$ (d/kg) koresponduje s hodnotami T_f pro skopové maso a černobylský spád a rovněž pro jehněčí maso kontaminované spadem ze zkoušek jaderných zbraní (H o w a r d, 1989).

Z uvedeného vyplývá, že přechodový koeficient je nutno vztahovat ke konkrétním podmínkám.

EXKRECE CS-137 Z MASA

Na obr. 1 je v semilogaritmických souřadnicích vynesena retenční křivka, tj. zjištěné množství deponovaného radiocesia (v procentech z původní hodnoty) v závislosti na čase (dny) po převedení zvířat na nekontaminovanou stravu. Jako 100 % je brána hodnota měrné aktivity uvedená v tab.I pro $t = 24$ dnů.

Z průběhu závislosti na obr. 1 jsou zřetelně vidět dva různé biologické poločasy vylučování Cs-137. Číselné hodnoty kratšího T_{b1} a delšího T_{b2} a odpovídající úseky



1. Retence radiocesia v králíčím mase vyjádřená jako část původního množství Cs-137 (%) v závislosti na čase t (dny). Vertikální linie odpovídají směrodatným odchylkám příslušných průměrů – Radiocesium retention in rabbit's meat expressed as a part of the original amount of Cs-137 (%) in dependence on time t (days). The vertical lines represent standard deviations of respective means

jejich platnosti zjistíme extrapolací pomalejší složky k $t = 0$ a odečtením ordinát extrapolované přímky od ordinát původní křivky. Výsledkem jsou následující hodnoty:

- první biologický poločas $T_{b_1} = 1,5$ dne
- odpovídající úsek $I_1 = 0,66$
- druhý biologický poločas $T_{b_2} = 66$ dní
- odpovídající úsek $I_2 = 0,34$
- první konstanta biologického úbytku $\lambda_{b_1} = 0,46$ (d)
- druhá konstanta biologického úbytku $\lambda_{b_2} = 0,010$ (d)

Retenční rovnice pro Cs-137 v králíčím masu pak je:

$$A_t = 0,66 \cdot e^{-0,46 \cdot t} + 0,34 \cdot e^{-0,01 \cdot t} \quad (6)$$

Fyzikální interpretace rovnice (6) je následující:

- 34 % z celkové aktivity deponované v králíčím masu se vyloučí rychlostí, která odpovídá biologickému poločasu $T_{b_1} = 1,5$ dne a biologické konstantě úbytku $\lambda_{b_1} = 0,46/\text{d}$
 - zbylých 66 % z celkové aktivity se vylučuje pomaleji, $T_{b_2} = 66$ d; $\lambda_{b_2} = 0,01/\text{d}$
- Z rovnice (6) lze vypočítat, že po převedení králíků na nekontaminované krmivo zůstane za 24 hodin v masu asi 75 % původního množství (aktivity) Cs-137 a za 5 dnů bude v masu králíků již jen asi 30 % původního množství Cs-137. Stejná veličina poklesne na 10 % přibližně za 120 dnů.

ZÁVĚR

Studium příjmu radiocesiumu Cs-137 prokázalo, že přibližně po 20 dnech ingesce kontaminovaného krmiva se v masu králíků ustavuje rovnovážný stav charakterizovaný přechodovým koeficientem krmivo > maso, $T_f = 0,29 \pm 0,15$ (d/kg). Koeficient je platný pro podmínky radioaktivního spadu po havárii černobylského typu.

Vylučování Cs-137 po převedení na nekontaminovaná krmiva probíhá dvěma biologickými poločasy, přičemž z praktického hlediska je důležitý poznatek, že za 5 dnů po poslední ingesci radiocesiumu se množství tohoto radionuklidu v masu králíků sníží asi na 30 % původní hodnoty.

Literatura

- ASSIMAKOPOULOS, P. A. - IOANNIDES, K. G. - PAKOU, A. A.: Measurement of the transfer coefficient for radiocaesium transport from a sheep's diet to its milk. *Health Physics*, 53, 1987, s. 685-689.
- HOWARD, B. J.: A comparison of radiocaesium transfer coefficients for sheep milk and muscle derived from both field and laboratory studies. *Sci. Envir.* 85, 1989, s. 189-198.
- JANDL, J. - PETR, I.: Ionizující záření v životním prostředí. Praha, SNTL 1988. 200 s.
- JANDL, J. - PROCHÁZKA, H. - LUKŠ, D.: The biological half-life of ^{137}Cs in snails. *J. radioanalyt. nucl. Chem. Letters*, 153, 1991, s. 327-332.

PROCHÁZKA, H. - JANDL, J. - JIRÁSEK, V. - BRUNCLÍK, T. - NOVOSAD, J. - KÁBELOVÁ, B.: Vliv radioaktivní kontaminace životního prostředí na zemědělskou produkci. [Výzkumná zpráva etapy P06-329-809-05-06.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1988.

VOIGT, G. - HENRICHS, K. - PRÖHL, G. - PARETZKE, H. G.: Measurements of transfer coefficients for Cs-137, Co-60, Mn-54, Na-22, I-131 and Tc-95m from feed into milk and beef. *Radiat. Envir. Biophys.*, 27, 1988, s. 143-152.

VOIGT, G. - PRÖHL, G. - MÜLLER, H. - BAUER, T. - LINDNER, J.P. - PROBSTMEIER, G. - RÖHRMOSER, G.: Determination of the transfer of caesium and iodine from feed into domestic animals. *Sci. Envir.*, 85, 1989, s. 329-338.

WARD, G. M. - KESZTHELYI, Z. - KRALOVANSKY, U. P. - JOHNSON, J. E.: Transfer of Cs-137 to milk and meat in Hungary from Chernobyl fallout with comparisons of worldwide fallout in the 1960s. *Health Physics*, 57, 1989, s. 587-592.

Došlo 8. 2. 1993

JANDL, J. - SLADOVNÍK, K. (Veterinary Research Institute, Brno):

The transfer of radiocaesium into rabbit's muscles and its excretion.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (7) : 427-432.

The uptake of radiocaesium Cs-137 in rabbit's muscle and its clearance were studied following the 24 days long ingestion of hay naturally contaminated as a consequence of the Chernobyl accident. The average radioactivity of hay was $2,294 \pm 345$ Bq/kg and the daily intake was 0.5 kg. It was found that after 20 days of ingestion the muscle radionuclide concentration equilibrated with that of the feed. The transfer coefficient T_f describing the fraction of the daily intake of Cs-137 found in a kilogram of rabbit's muscle was calculated: $T_f = 0.29 \pm 0.15$ d/kg. The biological Cs-137 clearance rate (after finishing the feeding with contaminated diet) was found to be ruled by two biological half-lives: $T_{b1} = 1.5$ days and $T_{b2} = 66$ days and fitting the following retention equation:

$$A_t = 0,66 \cdot e^{-0,46 \cdot t} + 0,34 \cdot e^{-0,01 \cdot t}$$

It means that 5 days after removing the animals from contaminated diet the amount of Cs-137 can be expected as 30 % of the initial one.

rabbit's meat; radiocaesium; transfer coefficient; biological half-life; Chernobyl

Contact Address:

RNDr. Jaromír J a n d l, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70,
621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321241, fax 05 41211229

DIFFERENTIATION OF *SALMONELLA ENTERITIDIS* AND *S. TYPHIMURIUM* BY PLASMID PROFILE ANALYSIS AND RESTRICTION ENDONUCLEASE ANALYSIS OF CHROMOSOMAL DNA

I. Rychlík, F. Šišák, P. Lány

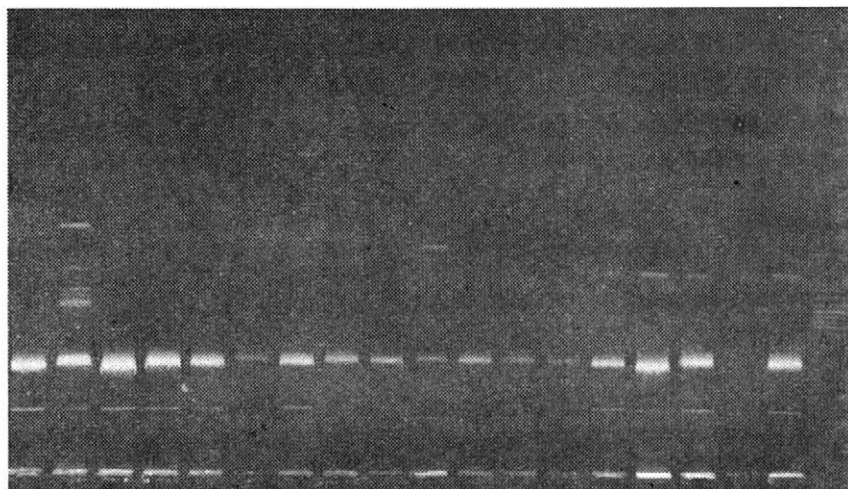
Veterinary Research Institute, Brno

Infections with *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* are frequent causes of food-borne diseases in man and are responsible for considerable economic losses in the poultry industry (Fantasia et al., 1991; Pohl et al., 1991). Methods for the more careful differentiation and typing of these two serotypes are necessary for the investigation of the spread and transmission of the infection. Conventional methods of *Salmonella* differentiation (bioassays, phage-typing, resistance to antibiotics) often lack the necessary resolution potential (Wray et al., 1987). Plasmid profile analysis and restriction analysis of chromosomal DNA, based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) have been used for the differentiation of *Salmonellae* (Wray et al., 1987; Nastasi et al., 1988; Franklin et al., 1990; Helmuth von et al., 1990; Martinetti and Altwegg, 1990). Rapid and unsophisticated analysis of the content of plasmid DNA tends to be preferred. However, some strains lack plasmids or may lose them during laboratory passages (Nastasi et al., 1988; Hartstein et al., 1991). On the other hand, restriction analysis of chromosomal DNA yields more constant and reliable information on bacterial strains (Tveten et al., 1991). The aim of this study was to compare 18 field strains of *S. enteritidis* and 12 strains of *S. typhimurium* on the basis of plasmid profile analysis and restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. Plasmid DNA content was determined and chromosomal DNA, isolated from bacterial cells immobilized in low-melting agarose, was digested with restriction endonuclease Pst I in 18 and 12 field strains of *S. enteritidis* and *S. typhimurium*, respectively. The resulting fragments were separated by pulse-field electrophoresis in agarose gel. Four plasmid and three chromosomal types, and 10 plasmid and nine chromosomal types were identified in the sets of *S. enteritidis* and *S. typhimurium*, respectively.

DNA; plasmid; restriction endonuclease; low-melting point agarose; pulse-field electrophoresis

MATERIAL AND METHODS

Eighteen and twelve field strains of *S. enteritidis* and *S. typhimurium*, respectively, were isolated in Czechoslovakia from different sources (human beings, poultry, food and environment). *S. enteritidis* strains „11” to „13” and „14” to „18” were



STRAIN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	M
PLASMID																			
TYPE	A	B	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A	A	D	D	D	D	D	

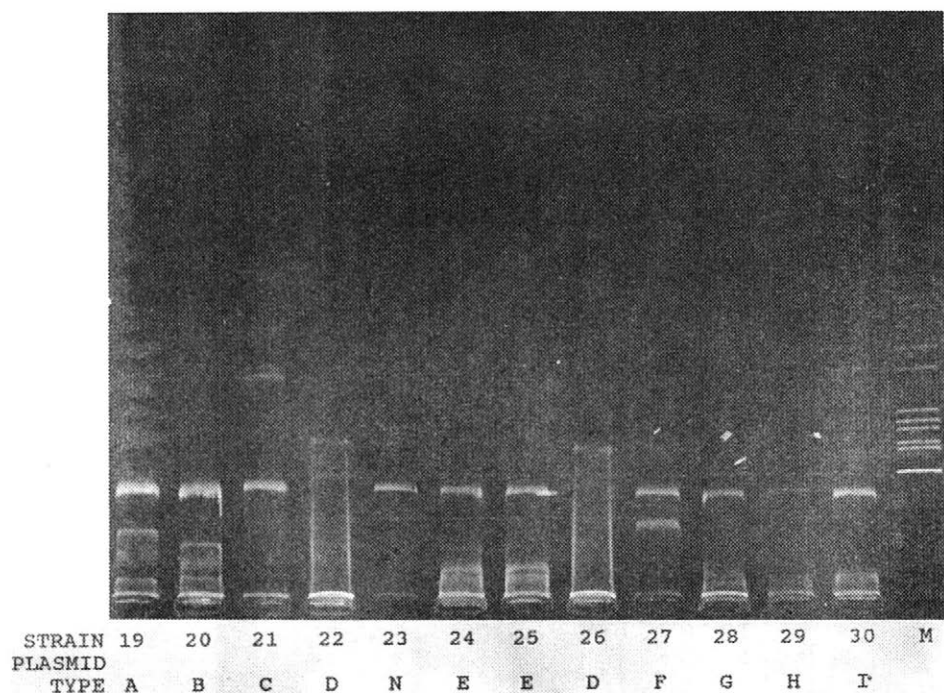
1. Plasmid profile analysis of 18 field strains of *S. enteritidis*. M - lambda DNA digested with Bst EII. Molecular weights in kbp from bottom to top are as follows: 8.4; 7.2; 6.3; 5.6; 4.8; 4.3; 3.6; 2.3; 1.9

isolated during two separated, well-documented outbreaks. For the DNA isolation all strains were propagated on blood agar at 37 °C.

Plasmid DNA was isolated according to the standard protocol (K a d o and L i u, 1981).

Total DNA was isolated from bacterial cells immobilized in low-melting agarose (Sigma) by the method of Y a n et al. (1991), and was digested with restriction endonuclease Pst I (New England Biolabs) according to the instructions of the manufacturer.

Agarose block with embedded chromosomal DNA were finely sliced and resuspended in 1x restriction buffer. Total amount of 50 U of restriction endonuclease was added in two steps with an interval of 3 hours. After 6 hours of digestion at 37 °C, the samples were heated to 68 °C for 5 minutes to melt the agarose, and transferred in liquid state onto 1x agarose gel. After the solidification of the sample in the well, the gel was transferred into an electrophoretic unit and pulse-field electrophoresis in FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis) arrangement (Bio-Rad Company) was started. Electrophoresis proceeded at 6 V/cm for 15 hours in 0.5x TBE (1% TBE is 0.089M Tris-HCl pH 7.5, 0.089M boric acid and 0.002M EDTA). The gel was stained in an ethidium bromide solution (0.5 µg/ml) and viewed and photographed through an orange filter on transilluminator (M a n i a t i s et al., 1982).



2. Plasmid profile analysis of 12 field strains of *S. typhimurium*. M - lambda DNA digested with Bst EII. Standard sample was not heated before loading onto gel and therefore there appeared additional 14.1 kb fragment. Molecular weights in kbp from bottom to top are as follows: 14.1; 8.4; 7.2; 6.3; 5.6; 4.8; 4.3; 3.6; 2.3; 1.9

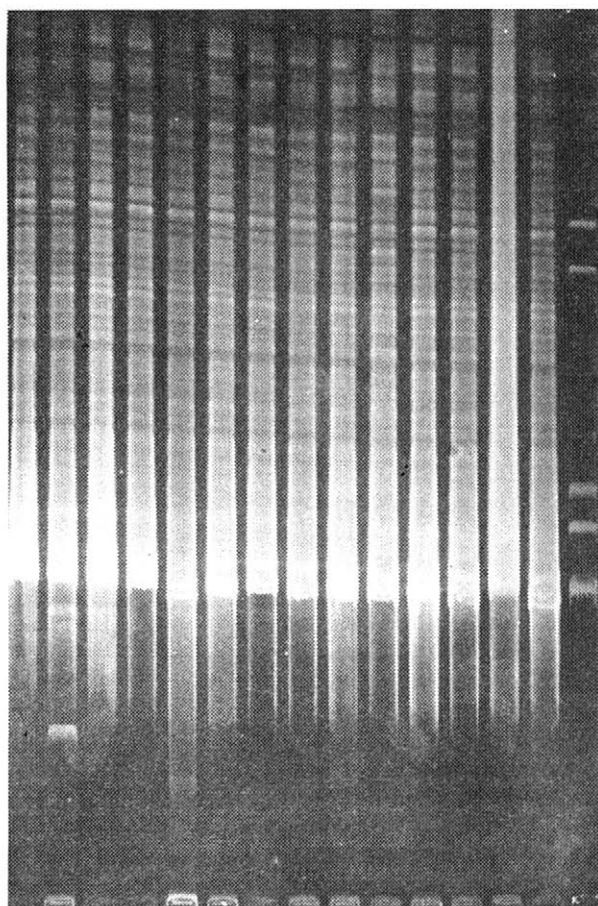
RESULTS AND DISCUSSION

Four plasmid types, designated as A, B, C and D, were identified in the set of *S. enteritidis* strains (Fig. 1). Only one large plasmid was present in 11 strains. Plasmids with lower molecular weights were demonstrated in addition to the large one in 6 strains („2", „14" to „18").

Nine plasmid profiles, designated as A to I, were identified in the set of *S. typhimurium* strains. No plasmid was detected in strain „23" (Fig. 2). Identical plasmid spectra were shared by pairs „22" and „26", and „24" and „25", respectively. The remaining strains could be differentiated from each other by the plasmid profile analysis.

Three chromosomal types, designated as I, II and III, were identified in the set of *S. enteritidis* strains after the digestion of chromosomal DNA with restriction endonucleases Pst I (Fig. 3). Only strains „2" and „10" differed from the rest in their spectra of restriction fragments.

Nine chromosomal types were identified in *S. typhimurium* after digestion with restriction endonuclease Pst I (Fig. 4).

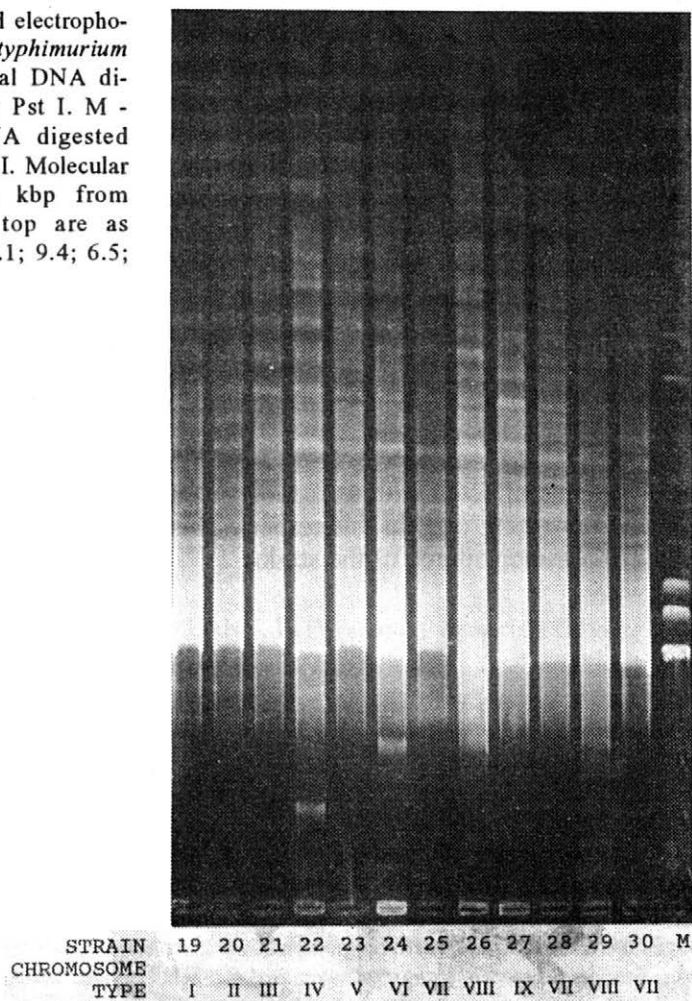


STRAIN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	M
CHROMOSOME															
TYPE	I	II	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I	I	I	

3. Pulse-field electrophoresis of *S. enteritidis* chromosomal DNA digested with Pst I. Strains 14 - 18 showed identical RFLP pattern (not shown). M - lambda DNA digested with Hind III. Molecular weights in kbp from bottom to top are as follows: 23.1; 9.4; 6.5; 4.3; 2.3; 2.0

Plasmid profile analysis demonstrated a considerable homogeneity of *S. enteritidis* serotype. All strains except one („10”) possessed one large plasmid, which was probably identical with that described earlier (Nakamura et al., 1985; Woodward et al., 1989; Halavatkár, 1993). Two of the three strains, differing in their plasmid content, also differed in patterns obtained after the digestion of chromosomal DNA with restriction endonuclease. Strains „14” to „18”, although differing in their plasmid profiles, shared an identical RFLP pattern with the rest of *S. enteritidis* strains.

4. Pulse-field electrophoresis of *S. typhimurium* chromosomal DNA digested with Pst I. M - lambda DNA digested with Hind III. Molecular weights in kbp from bottom to top are as follows: 23.1; 9.4; 6.5; 4.3; 2.3; 2.0



Strains from two outbreaks („11" to „13" and „14 to „18") showed identical plasmid profiles and RFLP patterns of chromosomal DNA. Moreover, strains „14" to „18" differed from the rest by the presence of one small plasmid.

The set of *S. typhimurium* strains was more heterogeneous when examined by plasmid profile and chromosomal DNA analysis as well. Strains „22" and „26" shared the same plasmid profile, but differed in chromosomal RFLP patterns (Fig. 2, 4). On the other hand, strains „28" and „30" differed in their plasmid profiles, but showed the identical RFLP pattern after digestion with Pst I.

The chromosomal DNA fragments were separated by pulse-field electrophoresis (Levy; Frebault et al., 1989; Ott et al., 1991). Short pulses enhanced the discerning power and the use of restriction enzymes with 8 bp target sequence

was not necessary. Unlike Martinetti and Altwegg (1990), we have obtained satisfactory results with the common 6 bp restriction endonuclease. However, in cases of special interest, it might be useful to use ribotyping (Martinetti and Altwegg, 1990) to obtain easily readable DNA fingerprints. Chromosomal DNA was isolated from bacterial cells immobilized in low-melting agarose (Yan et al., 1991). Thus non-specific breaks occurring during processing in the liquid medium could be avoided and the resolution potential subsequently increased.

The merits of nucleic acid analysis consist in higher speed, specificity and reproducibility. Therefore analysis of plasmid DNA content and restriction analysis of chromosomal DNA can contribute considerably to the more accurate differentiation of *Salmonellae* in epidemiological and taxonomical studies.

As shown by Olsen et al. (1992), who used plasmid profiles as epidemiological markers of *Salmonella* strains, poultry and poultry products are significant sources of human infections. This conclusion has also been confirmed in our investigations, in which strains „14" to „18", isolated from a hen, eggs, egg-containing meals and stool of patients affected with salmonellosis, shared one RFLP pattern, but differed from the remaining ones in this respect. This finding can be regarded as an evidence of the common source of the strains.

References

- FANTASIA, M. - FILETICI, E. - ANASTASIO, M. P. - MARCOZZI, M. D. - GRAMENZI, M. P. - AURELI, P.: Italian experience in *Salmonella enteritidis* 1978-1988: characterization of isolates from food and man. Int. J. F. Microbiol., 12, 1991, pp. 353-362.
- FRANKLIN, A. - LINNE, T. - REHBINDER, V.: Plasmid profile analysis and restriction fingerprinting of *Salmonella* DO-group strains. APMIS, 98, 1990, pp. 665-668.
- HALAVATKAR, H. - BARROW, P.: The role of a 54-kb plasmid in the virulence of strains of *Salmonella enteritidis* of phage type 4 for chicken and mice. J. med. Microbiol., 38, 1983, s. 171-176.
- HELMUTH VON, R. - MONTENEGRO, M.A. - STEINBECK, A. - SEILER, A. - PIETZSCH, O.: Molekularbiologische methoden zur epidemiologischen feincharakterisierung von krankheitserregern am beispiel von *Salmonella enteritidis* aus geflügel. Berl. Münch. tierärztl. Wschr., 103, 1990, pp. 416-421.
- KADO, C. I. - LIU, S. T.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol., 145, 1981, pp. 1365-137.
- LEVY-FREBAULT, V. V. - THOREL, M. F. - VARNEROT, A. - GICQUEL, B.: DNA polymorphism in *Mycobacterium paratuberculosis*, „Wood pigeon mycobacteria," and related mycobacteria analyzed by field inversion gel electrophoresis. J. clin. Microbiol., 27, 1989, pp. 2823-2826.
- MANIATIS, T. - FRITCH, E.F. - SAMBROOK, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Press 1982.
- MARTINETTI, G. - ALTWEGG, M.: rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *Salmonella enteritidis*. Res. Microbiol., 141, 1990, pp. 1151-1162.
- NAKAMURA, M. - SATO, S. - OHYA, T. - IKEDA, S.: Possible relationship of a 36-magadalton *Salmonella enteritidis* plasmid to virulence in mice. Infect. Immun., 47, 1985, pp. 831-833.
- NASTASI, A. - MAMMINA, C. - VILLAFRATE, M.R. - SCARLATA, G. - MASSENTI, M.F. - DIQUETTRO, M.: Multiple typing of *Salmonella typhimurium* isolates: an epidemiological study. Microbiologica, 11, 1988, pp. 173-178.

- OLSEN, J. E. - SORESEN, M. - BROWN, D. J. - GAARSLEV, K. - BISGAARD, M.: Plasmid profiles as an epidemiological marker in *Salmonella enterica* serovar Berta infections. *APMIS*, 100, 1992, pp. 221-228.
- OTT, M. - BENDER, L. - MARRRE, R. - HACKER, J.: Pulse field electrophoresis of genomic restriction fragments for the detection of nosocomial *Legionella pneumophila* in hospital water supplies. *J. clin. Microbiol.*, 29, 1991, pp. 813-815.
- POHL, P. - LINTERMANS, P. - MARIN, M. - COUTURIER, M.: Epidemiological study of *Salmonella enteritidis* strains of animal origin in Belgium. *Epidemiol. Infect.*, 106, 1991, pp. 11-16.
- TVETEN, Y. - KRISTIANSEN, B. E. - ASK, E. - JENKINS, A. - HOFSTAD, T.: DNA fingerprinting of isolates of *Staphylococcus aureus* from newborns and their contacts. *J. clin. Microbiol.*, 29, 1991, pp. 1100-1105.
- WOODWARD, M. J. - McLAREN, I. - WRAY, C.: Distribution of virulence plasmids within *Salmonellae*. *J. gen. Microbiol.*, 135, 1989, pp. 503-511.
- WRAY, C. - McLAREN, I. - PARKINSON, N.M. - BEEDELL, Y.: Differentiation of *Salmonella typhimurium* DT204c by plasmid profile and biotyping. *Veter. Rec.*, 28, 1987, pp. 514-516.
- YAN, W. - CHANG, N. - TAYLOR, D. E.: Pulse-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. *J. Infect. Diseases*, 163, 1991, pp. 1068-1072.

Received for publication on February 4th, 1993

RYCHLÍK, I. - ŠIŠÁK, F. - LÁNY, P. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno):

Diferenciace *Salmonella enteritidis* a *S. typhimurium* analýzou plazmidových profilů a restrikční analýzou chromozomální DNA.

Vet. Med. - Czech., 38, 1993 (7) : 433-439.

Práce byla zaměřena na ověření možností molekulárně biologických metod pro hlubší diferenciaci a typizaci *S. enteritidis* a *S. typhimurium*.

Z 18 kmenů *S. enteritidis* a 12 kmenů *S. typhimurium* byla izolována plazmidová DNA a porovnány plazmidové profily. U všech kmenů byla izolována i chromozomální DNA z bakterií imobilizovaných v nízko tuhnutí agaróze. Po rozštěpení chromozomální DNA restrikční endonukleázou Pst I byly vzniklé fragmenty odděleny pulsní elektroforézou v agarózovém gelu. U *S. enteritidis* byly popsány 4 plazmidové a 3 chromozomální typy, u *S. typhimurium* bylo popsáno 10 plazmidových a 9 chromozomálních typů.

Přednosti analýzy nukleových kyselin oproti standardním metodám typizace salmonel (fagotypizace, rezistence k antibiotikům aj.) spočívají v jejich rychlosti, specifitě a reprodukovatelnosti. Analýza plazmidových profilů a restrikční analýza chromozomální DNA mohou z těchto důvodů významně přispět k hlubší diferenciaci salmonel i ostatních bakterií při epidemiologických a taxonomických studiích.

DNA; plazmid; restrikční endonukleáza; nízko tuhnutí agaróza; pulsní elektroforéza

Contact Address:

RNDr. Jan Rychlík, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70,
621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321241, fax 05 41211229

pro Vás v letošním roce připravil novou publikaci,
která by neměla chybět ve Vaší odborné knihovně:

ČESKO-NĚMECKÝ A NĚMECKO-ČESKÝ SLOVNÍK PRO ZEMĚDĚLCE

Slovník obsahuje nejdůležitější a nejfrekventovanější zemědělské výrazy v německém jazyce.

Je sestaven na základě odborné analýzy frekvence německých zemědělských termínů v odborném i populárním německém tisku a s výrazy používanými v německém zemědělství.

Usnadní Vám četbu odborných časopisů a knih a umožní Vám dále se vzdělávat a dorozumět se.

Slovník uvádí v první řadě stěžejní termíny, jejichž znalost je nutná pro pochopení dalších kombinací. Jsou zde zahrnuty takové německé výrazy, které se ve velkých slovnících marně hledají.

Slovník je doplněn o volně vloženou přílohu, obsahující základní termíny z kalendáře, měř, hmotností, frází pro styk s úřady, domluvu na poště, na nádraží, při silničním provozu aj.

Cena slovníku je 50,- Kč.

Objednávky posílejte na adresu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
pí. Hrnčířová
Slezská 7

120 56 Praha 2

VPLYV KVALITY TUKOVEJ ZLOŽKY VSTUPNÝCH SUROVÍN NA KVALITU TUKOV VO VÝROBKU

P. Bystrický, M. Pipová

Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

Práca sa zaoberá štúdiom vplyvu kvality tuku hydinového separovaného mäsa a bravčového výrobného mäsa na kvalitu tuku výsledného výrobku - jemnej hydinovej salámy. Vo vzorkách z hydinového separovaného mäsa, bravčového výrobného mäsa, z hotového diela pred jeho ďalším spracovaním a zo samotnej jemnej hydinovej salámy v deň jej výroby, po troch dňoch a po šiestich dňoch bolo stanovené číslo kyslosti tukov, peroxidové číslo a tiobarbiturové číslo. Podstatný vplyv na kvalitu tuku diela a následne aj na kvalitu tuku hotovej jemnej hydinovej salámy má kvalita tuku hydinového separovaného mäsa. Po spracovaní diela na hotový výrobok sa prejavuje vplyv tepelného opracovania, pričom výrazne stúpa hodnota peroxidového čísla tuku čerstvej salámy. Hodnoty čísla kyslosti tukov vo vzorkách vstupných surovín sú závislé na sezóne, v ktorej boli odobrané. Podstatne výraznejší je vplyv sezóny na kvalitu tuku hydinového separovaného mäsa ako na kvalitu tuku mäsa bravčového výrobného.

hydinové separované mäso; bravčové výrobné mäso; jemná hydinová saláma; číslo kyslosti tukov; peroxidové číslo tukov; tiobarbiturové číslo

Kvalita vstupných surovín sa výrazne podieľa na kvalite hotového výrobku. Pri optimalizovaní technologického postupu výroby a výberu surovín pre samotný výrobok sú informácie, ako sa v priebehu spracovania suroviny menia jej vlastnosti a aký majú podiel na kvalite hotového výrobku, nepostrádateľné. Z hľadiska hygienického a dietetického je zase potrebné vedieť, kde v procese výroby zasiahnuť v prípade, že vlastnosti hotovej potraviny sú neprijateľné.

Mäsové výrobky, ktorých súčasťou je mechanicky separované mäso, by mali aj za použitia lacných surovín (nízkej kvality) byť pre konzumenta príťažlivé. Vzhľadom na to, že sa jedná o výrobky, ktoré sú tepelne opracované, nemal by byť pre určenie doby skladovateľnosti limitujúcim faktorom počet a druh vo výrobku sa vyskytujúcich mikroorganizmov, ale skôr senzorické zmeny. Významnou zložkou, podieľajúcou sa na tvorbe zmyslových charakteristík sú lipidy. Zmeny, ktoré prebiehajú v tukovej zložke mäsových výrobkov sa spravidla prejavujú výrazne a negatívne pri ich zmyslovom hodnotení. Preto cieľom experimentu bolo stanoviť, aký podiel má tuková zložka vstupných surovín na kvalite tuku hotového výrobku.

Ako predstaviteľ tohoto typu výrobkov bola zvolená jemná hydinová saláma a to aj preto, lebo jej názov u bežného zákazníka vyvoláva dojem, že výrobok je vyrobený len z hydinového mäsa a teda obsahuje málo tuku.

Ako mieru vyjadrujúcu hydrolytické poškodenie tukov sme stanovovali číslo kyslosti tukov (ČKT), ako mieru oxidatívneho poškodenia peroxidové číslo (PČ) a ako mieru nežiadúcich zmien, podmienených oxidáciou nenasýtených mastných kyselín, hlavne vo frakcii fosfolipidov (P i k u l a K u m m e r o w, 1991) a s tým súvisiacich zmien organoleptických (A n g a L y o n, 1990) sme stanovili číslo tiobarbiturové (TBA Č.).

MATERIÁL A METÓDY

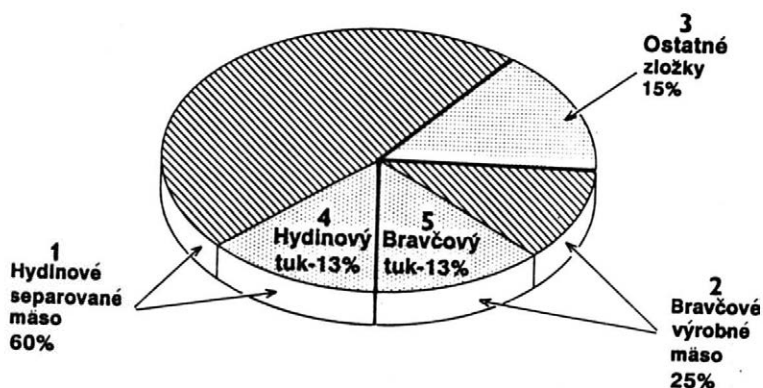
Do experimentu bolo zvolené použiť jemnú hydinovú salámu, ktorá obsahuje 60 % separovaného hydinového mäsa (počas trvania celého experimentu separovaného z kuracích kostier a krídiel s kožou) a 25 % bravčového výrobného mäsa (Oborová norma 1/91). Aby bolo možné určiť podiel lipidov jednotlivých zložiek na kvalitu tuku v hotovom výrobku, boli odoberané vzorky z hydinového separovaného mäsa, bravčového výrobného mäsa a z hotového diela pred jeho ďalším spracovaním. V samotnej jemnej hydinovej saláme bola kvalita stanovovaná v deň jej výroby, po troch dňoch (záručná doba výrobku) a po šiestich dňoch tak, aby bol prehľad o zmenách, ktoré v tuku salámy prebiehajú. V priebehu štyroch mesiacov boli vzorky desaťkrát odoberané priamo z výroby a jednotlivé stanovenia boli z každej odobranej vzorky robené v troch paralelkách.

Vzhľadom na charakter lipidov, v ktorých sme považovali za vhodné sledovať zmeny, zvolili sme ich extrakciu zmesou chloroformu a metanolu podľa B ö d ö r o v e j (1991). V takto extrahovaných lipidoch bolo stanovené ČKT a PČ. Modifikovanou metodikou podľa autorov B u l l a M a r n e t t (1985) bolo vo vzorkách stanovené TBA číslo: ku 40 g vzorky sa pridá 100 ml destilovanej vody a homogenizuje sa 2 x 30 sekúnd. Potom sa pridá 100 ml 10 % kyseliny trichloroctovej a nechá sa 10 min stáť, aby sa vyzrážali vo vode rozpustené bielkoviny. Po filtrácii sa k 8 ml filtrátu pridajú 2 ml 0,06 mol/l roztoku kyseliny tiobarbiturovej a inkubuje sa 90 min pri teplote 80 °C. Absorbancia sa meria pri vlnovej dĺžke 532 nm oproti slepému pokusu. Vzhľadom na to, že reakcia kyseliny tiobarbiturovej pri stanovení TBA čísla nie je špecifická, robili sme prepočet tejto hodnoty na koncentráciu malonylaldehydu (MA) na 1 g tuku prepočtom pomocou molárneho absorbančného koeficientu komplexu MA-TBA $\epsilon = 156\,000$ mol/cm. Z každej vzorky boli hodnoty vytvárané ako aritmetický priemer troch paralelných stanovení.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerný podiel jednotlivých zložiek jemnej hydinovej salámy a množstva tuku v nich je zrejmý z obr. 1, priemerné množstvo tuku, stanovené v jednotlivých vzorkách, je uvedené na obr. 2 a priemerné hodnoty a rozpätia nameraných hodnôt v jednotlivých vzorkách sú uvedené na obr. 3, 4 a 5. Priemerné hodnoty troch paralelných stanovení ČKT PČ a TBA Č. v jednotlivých z desiatich samostatných opakovaní sú zobrazené na obr. 6, 7 a 8.

Hodnoty ČKT v jednotlivých vzorkách sa vyznačujú značným rozptylom. Z obr. 3 je zrejmé, že vo všetkých vzorkách je tento rozptyl približne rovnaký.

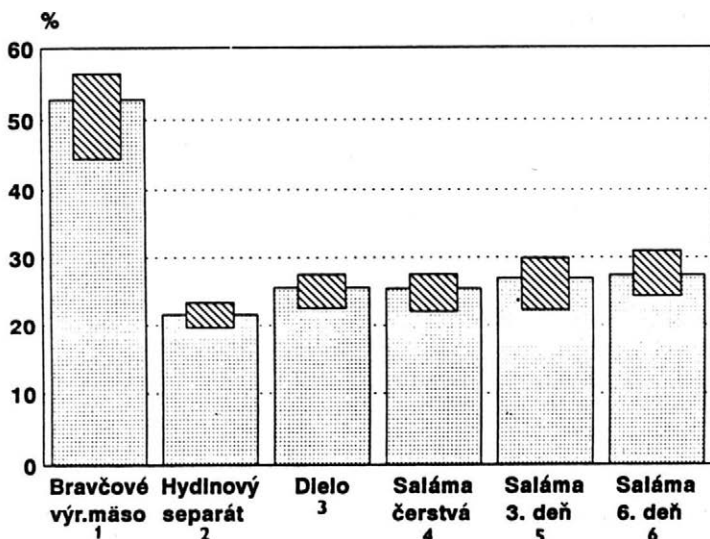


1. Zloženie jemnej hydinovej salámy - podiel tukov - Composition of fine poultry sausage - fat portions

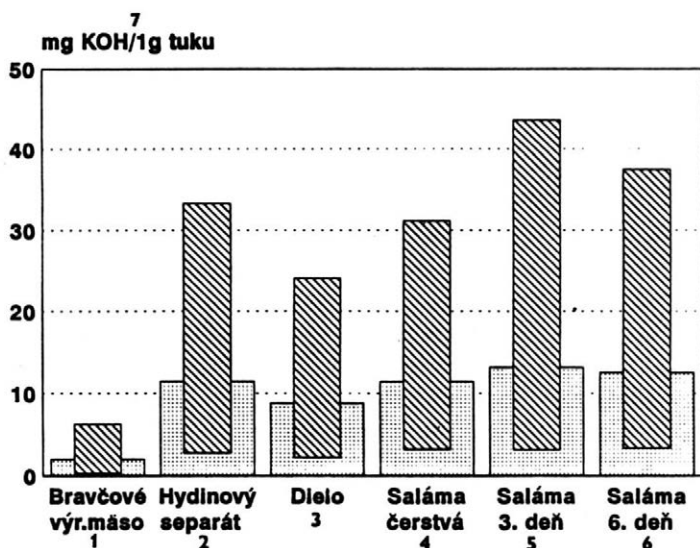
¹deboned poultry meat, ²deboned pork meat, ³other components, ⁴poultry fat, ⁵pork fat

2. Priemerný obsah tuku v jednotlivých skúmaných zložkách - Average fat content of individual components examined

¹prepared pork meat, ²deboned poultry meat, ³prepared meat, ⁴fresh sausage, ⁵sausage on day 3, ⁶sausage on day 6

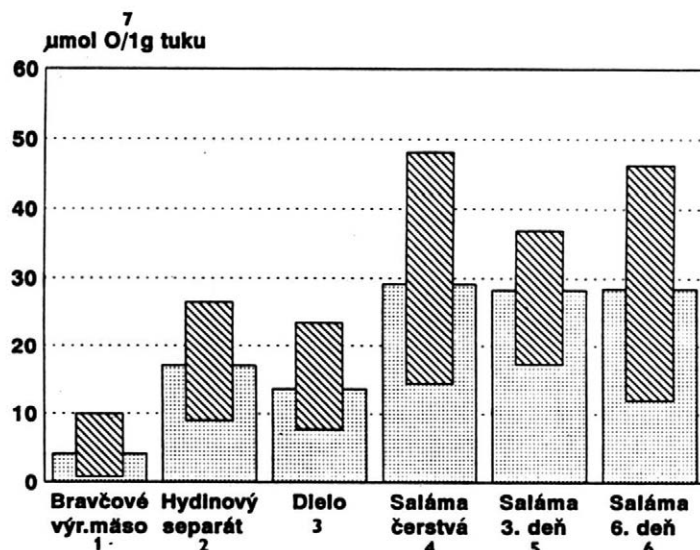


Absolútne hodnoty ČKT v hydinovom separovanom mäse sú však podstatne vyššie ako v bravčovom výrobnom mäse. To sa prejaví vo zvýšení ČKT diela a hotovej salámy, ktoré obsahujú zhruba rovnaké množstvo tuku pochádzajúceho z mäsa hydinového a z mäsa bravčového (obr. 1). Z obr. 6 je evidentné, že ČKT v diela a vo vzorkách salámy je určené hlavne hodnotou ČKT hydinového separovaného mäsa, hoci korelácia medzi ČKT bravčového výrobného mäsa a ČKT diela ($r = 0,926$; $P < 0,005$) a salám ($r_0 = 0,906$; $P_0 < 0,005$; $r_3 = 0,964$; $P_3 < 0,006$; $r_6 = 0,947$; $P_6 < 0,005$) je vysoko signifikantná a len o niečo nižšia ako korelácia



3. Priemerná hodnota ČKT v jednotlivých skúmaných zložkách – Average ČKT values of individual components examined

For 1 - 6 see Fig. 2;
7 mg KOH/1g fat



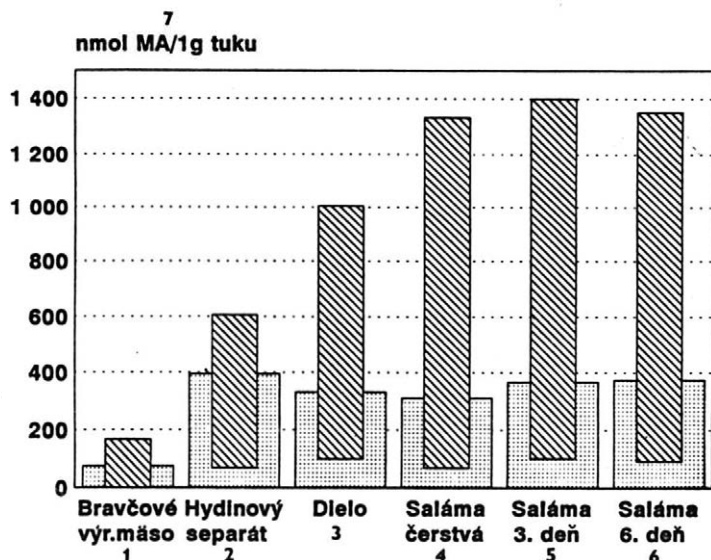
4. Priemerná hodnota PČ v jednotlivých skúmaných zložkách – Average PČ values of individual components examined

For 1 - 6 see Fig. 2;
7 μmol O/1g fat

medzi ČKT hydínového separovaného mäsa a ČKT diela ($r = 0,996$, $P < 0,005$) a salám ($r_0 = 0,997$; $P_0 < 0,005$; $r_3 = 0,968$; $P_3 < 0,005$; $r_6 = 0,947$; $P_6 < 0,005$).

Hodnoty PČ v jednotlivých vzorkách sú charakterizované značným rozptylom a na obr. 4 vidno, že najväčším rozptylom hodnôt PČ sa vyznačuje bravčové výrobné mäso. Absolútne hodnoty PČ v hydínovom separovanom mäse sú však podstatne vyššie ako v bravčovom výrobnom mäse. To sa prejaví vo zvýšení PČ diela a hotovej salámy, ale tiež na rozptyloch hodnôt PČ v nich, ktoré sa blížila rozptylu hodnôt PČ v hydínovom separovanom mäse. Korelácia medzi PČ bravčového výrobného mäsa a PČ diela ($r = 0,081$; $P > 0,5$) a salám ($r_0 = -0,138$; $P_0 = 0,47$; $r_3 = 0,142$;

5. Priemerná hodnota TBA Č. v jednotlivých skúmaných zložkách – Average TBA Č. values of individual components examined
For 1 - 6 see Fig. 2;
nmol MA/1g fat



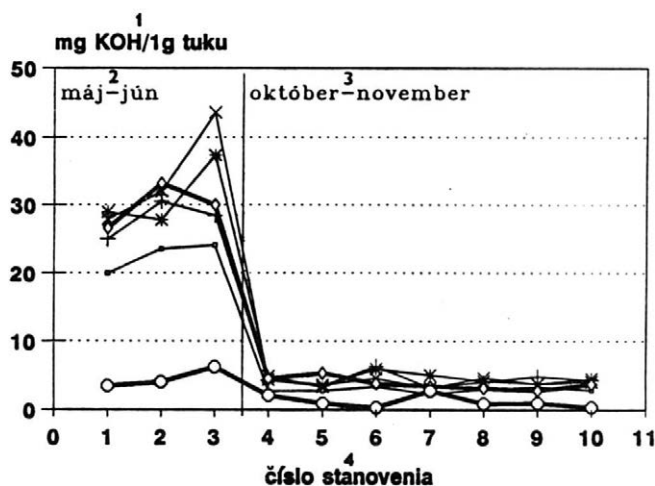
$P_3 = 0,45$; $r_6 = -0,032$; $P_6 > 0,5$) nie je prakticky žiadna, ale korelácia medzi PČ hydinového separovaného mäsa a PČ diela ($r = 0,846$; $P < 0,005$) je vysoko signifikantná. Korelácia medzi PČ hydinového separovaného mäsa a PČ salámy ($r_0 = 0,369$; $P_0 < 0,05$; $r_3 = 0,284$; $P_3 > 0,5$; $r_6 = 0,738$; $P_6 < 0,005$) už nenaznačuje priamy vplyv PČ hydinového separovaného mäsa. Na obr. 7 je však vidno, že PČ v diela a vo vzorkách salámy je určované hlavne hodnotou PČ hydinového separovaného mäsa, ktorého tuk je bohatý na nenasýtené mastné kyseliny (M o e r c k a B a l l, 1974; M í k o v á a i., 1992).

Sledovaním hodnoty TBA čísla v jednotlivých vzorkách (bravčové výrobné mäso, hydinové separované mäso, dielo, saláma v deň výroby, saláma po troch dňoch od výroby a saláma po šiestich dňoch od výroby) sme nezistili žiadne vzájomné korelácie. Sledovaním TBA čísla sme sa snažili postrehnúť vplyv tuku z jednotlivých zdrojov na senzorické vlastnosti výrobku, ale jediným podstatným zistením bolo, že do diela vzorky č. 6 bol pridaný materiál, ktorý podstatne zvýšil hodnoty TBA čísla, pričom nepochádzal ani z mäsa bravčového výrobného, ani z mäsa hydinového separovaného.

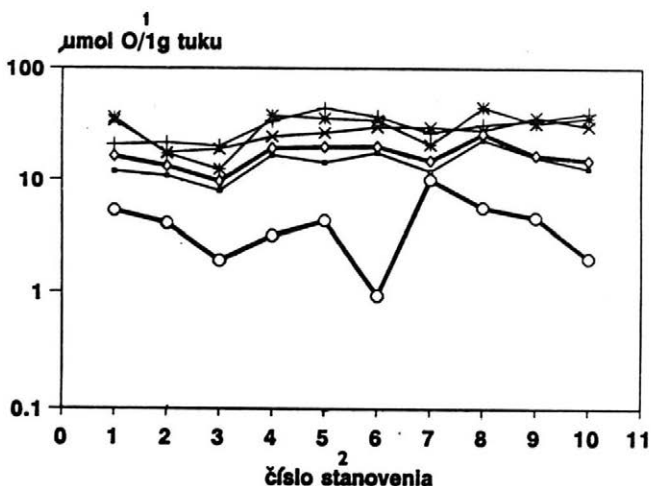
ZÁVER

Podstatný vplyv na kvalitu tuku diela a následne aj na kvalitu tuku hotovej jemnej salámy má kvalita tuku hydinového separovaného mäsa. Vzhľadom na jeho charakter (vyššie množstvo nenasýtených mastných kyselín) a spôsob získavania (mikrobiálna kontaminácia, mechanická dezintegrácia tkaniva), je tuk mechanicky separovaného hydinového mäsa citlivejší na oxidatívne a aj hydrolytické zmeny, ako tuk mäsa bravčového výrobného.

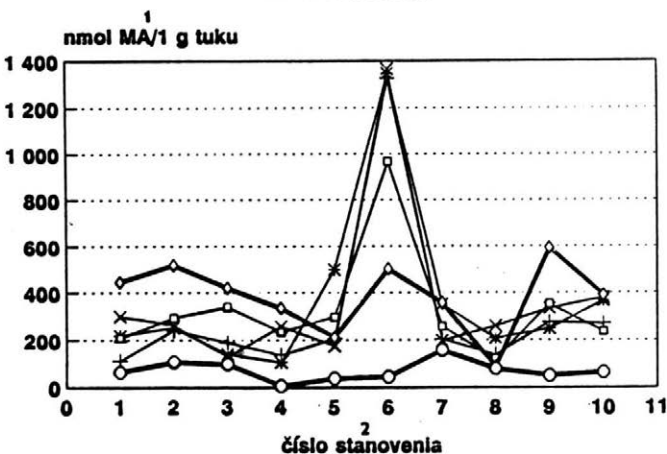
Vzostup nežiadúcich zmien je badateľný po spracovaní diela na hotový výrobok. V tomto stupni sa prejavuje vplyv tepelného opracovania, pričom výrazne stúpa



6. Priemerné hodnoty ČKT každej z desiatich odobraných vzoriek v priebehu experimentu – Average ČKT values of each of ten samples taken during the experiment
¹mg KOH/1g fat, ²May-June, ³October-November, ⁴number of determination



7. Priemerné hodnoty PČ každej z desiatich odobraných vzoriek v priebehu experimentu – Average PČ values of each of ten samples taken during the experiment
¹μmol O/1g fat, ²number of determination



8. Priemerné hodnoty TBA Č. každej z desiatich odobraných vzoriek v priebehu experimentu – Average TBA Č. values of each of ten samples taken during the experiment
¹nmol MA/1g fat, ²number of determination

hodnota PČ tuku v čerstvej saláme. V priebehu ďalších šiestich dní sa táto hodnota prakticky nemení. Hydrolytické zmeny v tuku po tepelnom opracovaní sú len mierne a v nasledujúcich dňoch taktiež len mierne vzrastajú. Možno to pripísať na vrub silnej eliminácii mikroflóry, pôvodne prítomnej v tepelne neopracovaných zložkách výrobku.

Absolútne hodnoty ČKT vo všetkých vzorkách sú závislé na sezóne, v ktorej boli odobrané. Na obr. 6 dobre vidno rozdiely medzi vzorkami odobranými v októbri až novembri (vzorky 5 až 10). Vzhľadom na už spomínaný charakter a spôsob získavania hydinového separovaného mäsa je badateľný výraznejší vplyv sezóny na kvalitu tuku v ňom sa nachádzajúceho, ako na kvalitu tuku mäsa bravčového výrobného. Pretože počas celého sledovaného obdobia bolo mechanicky separované mäso získavané z rovnako vykostenej hydiny, možno vyššie hodnoty ČKT, stanovené v období máj až jún, vysvetliť vyššou teplotou prostredia, v ktorom mechanicky separované hydinové mäso čaká na ďalšie spracovanie a ktorá umožňuje lipolytickej mikroflóre hydrolyzovať väčšie množstvo lipidov a taktiež lipázy, pochádzajúce z dezintegrovaného tkaniva majú vyššiu enzymatickú aktivitu.

Literatúra

- ANG, C. Y. W. - LYON, B. G.: Evaluation of warmed-over flavor during choll storage of cooked broiler breast, thigh and skin by chemical, instrumental and sensory methods. *J. Fd. Sci.*, 55, 1990, s. 6444-648.
- BÖDÖROVÁ, H.: In: Atestačná práca, 1991, Nitra.
- BULL, A. - MARNETT, L. J.: Determination of malonylaldehyde by ion-pairing HPLC. *Analyt. Biochem.*, 149, 1985, s. 284-290.
- MÍKOVÁ, K. - HAVLÍKOVÁ, L. - ANDRASOVÁ, A.: Sledování oxidačních změn tukové složky mechanicky separovaného drůbežního masa. *Průmysl potravin*, 43, 1992, s. 268-271.
- MOERCK, K. E. - BALL, H. R.: Lipid oxidation in mechanically deboned chicken meat., *J. Fd. Sci.*, 39, 1974, s. 876-879.
- PIKUL, J. - KUMMEROW, F. A.: Thiobarbituric acid reactive substance formation as affected by distribution of polyenoic fatty acids in individual phospholipids. *J. agric. Fd Chem.*, 39, 1991, s. 451-457.
- Oborová norma 1/91, Košice, 1991.

Došlo 1. 2. 1993

BYSTRICKÝ, P. - PIPOVÁ, M. (University of Veterinary Medicine, Košice):

The effect of fat component quality in raw materials on fat quality in the final product.
Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (7) : 441-448.

The paper deals with the influence of mechanically deboned poultry meat fat and pork fat on the fat quality of the final product, tender poultry sausage. Three values were estimated: acid value (ČKT) of fat as a measure of its hydrolytic breakage, peroxide value (PČ) as a degree of oxidative changes in fat, and thiobarbituric acid number (TBA Č.) as a value reflecting undesired degradative changes connected with organoleptic changes. Samples were taken from mechanically deboned poultry meat, pork, sausage

parts, and fine poultry sausage (60 % of mechanically deboned poultry meat, 25 % of pork) immediately after processing and production, on the third day after processing (which is the last day of the official shelf-life) and on the sixth day after processing. The samples were taken on ten occasions and every sample was estimated in three parallel assays. These ten estimations were made over a period of four months. Acid value and peroxide value were estimated in fat extracted from the samples by the method described by B ö d ř o v á (1991). TBA number was estimated using a modified method reported by B u l l and M a r n e t t (1985). Malonylaldehyde concentrations (MA) per g of fat were calculated using the molar absorption coefficient of MA-TBA complex $\epsilon = 149,000 \text{ mol/cm}$. Results were calculated as a mean of three parallels. The composition of fine poultry sausage and the amount of fat are presented in Fig. 1. Average amounts of fat estimated in individual samples are shown in Fig. 2. Average values with their spans of individual estimations are represented in Figs. 3, 4, and 5. Average values from three parallels of ČKT, PČ and TBA Č. estimations taken from the ten tested samples are presented in Figs. 6, 7, and 8. The ČKT values for individual samples are characterized by considerable divergence but the percentage of this divergence is almost the same in all samples. The absolute values of ČKT in mechanically deboned poultry meat are considerably higher than those in pork, and this fact is reflected in increasing ČKT values of sausage parts and sausage which contain equal amounts of poultry and pork fat (Fig. 1). It is evident from Fig. 6 that ČKT of sausage parts and sausage relates more closely to ČKT of mechanically deboned poultry meat fat than to the value of pork, though correlations are almost the same. All PČ values show a broad span. The PČ value of mechanically deboned poultry meat fat influences PČ of sausage parts and sausage, to the highest degree. This is also evident from Fig. 7. The quality of mechanically deboned poultry meat fat has a primary effect on the quality of fat in sausage part and consequently on fine poultry sausage fat. Mechanically deboned poultry meat is relatively low in fat but its nature (higher amount of unsaturated fatty acids) and the means of its acquisition (microbial contamination, mechanical tissue disintegration) allow higher oxidative and hydrolytic damage than in pork fat. An increase of undesired changes is evident after the processing of sausage parts to final product. During this step thermal treatment causes an increase in sausage fat PČ values. During the subsequent six days the PČ value is nearly unchanged. Hydrolytic changes in fat after thermal treatment are low, and this is due to elimination of bacteria originally present in raw materials. The absolute ČKT values are highly dependent on the sampling season (Fig. 6) and on the origin of fat.

deboned poultry meat; prepared pork meat; fine poultry sausage; fat acid number; fat peroxide number; thiobarbituric acid number

Contact Address:

MVDr. Pavel B y s t r i c k ý, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73,
041 81 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 32111-15, fax 095 767675

OBSAH – CONTENTS

Hipíková V., Mojžišová J., Bajová V., Takáčová D., Strojný L.: Hodnotenie niektorých ukazovateľov bunecnej imunity po experimentálnej infekcii vírusom IBR u teliat ošetrených glukánom – Evaluation of some parameters of cellular immunity after experimental infection with IBR virus in glucane-treated calves	385
Paulík Š., Bajová V., Benko G.: Úroveň oneskorenej precitlivelosti a primárnej protilátkovej odpovede po aplikácii inaktivovanej olejovej vakcíny IBR u teliat premedikovaných glukánom – The level of delayed hypersensitivity and primary immune reaction after administration of inactivated oil IBR vaccine to glucane-premedicated calves	395
Bomba A., Králiček E., Koniarová I., Lešník F., Pošivák J., Bučko V., Žitňan R.: Získavanie a odchov gnotobiotických jahniat a ich využitie vo veterinárnej medicíne – The recovery and rearing of gnotobiotic lambs and their use in veterinary medicine	403
Krajčovičová - Kudláčková M., Ozdín L.: Vplyv rastlinnej výživy na niektoré hodnoty metabolizmu bielkovín a tukov u potkanov v rôznom veku – The effect of vegetable diet on some values of protein and fat metabolism in len rats of different age	413
Jandl J., Sladovník K.: Přechod radiocesia do králíčího masa a jeho exkrece – The transfer of radiocaesium into rabbit's muscles and its excretion ...	427
Rychlík I., Šišák F., Lány P.: Differentiation of <i>Salmonella enteritidis</i> and <i>S. typhimurium</i> by plasmid profile analysis and restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA – Differenciace <i>Salmonella enteritidis</i> a <i>S. typhimurium</i> analýzou plazmidových profilů a restrikční analýzou chromozomální DNA.	433
Bystrický P., Pipová M.: Vplyv kvality tukovej zložky vstupných surovín na kvalitu tukov vo výrobku – The effect of fat component quality in raw materials on fat quality in the final product.	441



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, Hvoždanská 5-7, 149 00 Praha 4-Roztyly.