ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

4

NÍK 39 (LXVII)
HA 1994
ISSN 0375-8427

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
SLOVENSKÁ AKADÉMIA PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

VOLUME 39 (1994)

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

MVDr. Ivan H e r z i g , DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

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

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

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

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

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

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

Editor in Chief - Vedoucí redaktorka

Ing. Zdenka Radošová

Institute of Agricultural and Food Information, Prague 1994

VETERINARY RESEARCH INSTITUTE
(Výzkumný ústav veterinárního lékařství)

Hudcova 70
621 32 BRNO, CZECH REPUBLIC

Phone: 42 5 41212462
Fax: 42 5 41211229

Director: Prof. MVDr. Karel H r u š k a , CSc.

Veterinary Research Institute in Brno was founded in 1956. More than 100 graduated scientists are working in this facility now. All possibilities to increase the collaboration with the institutes and universities abroad would be greatly appreciated. The List of Research Activities and Selected Papers is therefore published in this issue. All personal contacts, requests for reprints, information on research meetings, proposals of joint research projects, and other suggestions are welcome.

The following diagnostic kits and components are available for testing and commercial distribution:
Dot-ELISA Rotavirus
Dot-ELISA Rabbit Haemorrhagic Disease Virus
ELISA Antibodies to Enzootic Bovine Leucosis Virus
ELISA Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Antibodies
ELISA Bovine Viral Diarrhea Antibodies
ELISA Pseudorabies Antibodies
ELISA Rabbit Haemorrhagic Disease Antibodies
ELISA Infectious Pancreatic Necrosis Virus of Salmons
ELISA Spring Viremia of Carp Virus
ELISA Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus of Salmons
ELISA *Salmonella enteritidis* Antibodies in Poultry
ELISA *Salmonella typhimurium* Antibodies in Poultry
E. coli Strains and Diagnostic Antisera
IDA Test - Ptb set for the Demonstration of Precipitating Antibodies to the Causal Agent of Paratuberculosis (Johne' s Disease) by Agar Gel Immunodiffusion Test
MYKOBAKTIN J for Bacteriological Diagnosis of Paratuberculosis (Johne' s Disease)

LIST OF RESEARCH ACTIVITIES AND SELECTED PAPERS PUBLISHED IN 1992 AND 1993

INFECTIOUS DISEASES

1. Infectious bovine rhinotracheitis (J. Štěpánek, V. Rozkošný)
2. Diagnostics and principles of control of bovine virus diarrhoea - mucosal disease (I. Pšikal)
3. Gastrointestinal virus infections of calves (J. Štěpánek, V. Rozkošný)
4. Demonstration of antibodies to pseudorabies virus in meat (L. Rodák, B. Šmíd)
5. Gastrointestinal virus infections of swine (B. Šmíd, J. Musilová)
6. Epidemiology and diagnosis of swine fever (L. Rodák, B. Šmíd)
7. Differential diagnosis of calicivirus infections of rabbits and hares (B. Šmíd, L. Valíček)
8. Immunological diagnosis of virus infections of fishes (T. Veselý, L. Rodák)
9. Virus infections of dogs and cats (J. Štěpánek, J. Nezval)
10. Enhancement of immunogenic activity of viral proteins (J. Franz, J. Hampl)
11. Enteric *Escherichia coli* infections in weaned piglets (P. Alexa)
12. Diagnosis and control of animal paratuberculosis, tuberculosis and other mycobacterioses (M. Pavlas, I. Pavlík)
13. Respiratory infections of farm animals (L. Ulmann, M. Bartoš)
14. Salmonellosis of farm animals and poultry (F. Šišák, P. Lány)
15. Autochtonnous lactacidogenic microflora containing probiotics for poultry and swine (F. Šišák, P. Lány)
16. Diagnostic and therapeutic methods in canine and feline clinical immunology (M. Toman)
17. Immunostimulants and adjuvants in the prevention of infectious diseases of farm animals (J. Krejčí, J. Turánek)
18. Enhancement of vaccination effects by new vaccination procedures (J. Krejčí)

Selected Publications

19. DVOŘÁK, R. - ŠTĚPÁNEK, J. - PŠIKAL, I. - FRANZ, J.: Isolation of rotaviruses from calves with acute enteritis and their cultivation *in vitro*. Acta vet. (Brno), *62*, 1993: 71-77.
20. DVOŘÁKOVÁ, J.: Výskyt mykoplazmové pneumonie prasat v ČSFR (Occurrence of porcine mycoplasmal pneumonia in ČSFR). Veterinářství, *43*, 1993: 256-257.
21. FISCHER, O. - ZENDULKOVÁ, D.: Straining with an acridine orange derivative for the detection of mycoplasmas in cell cultures. Acta vet. (Brno), *62*, 1993: 49-53.

22. FRANZ, J. - HAMPL, J. - ŠTĚPÁNEK, J. - ŠMÍD, B.: Preparation of immunostimulating complexes (ISCOM) containing bovine herpesvirus 1 proteins. Acta vet. (Brno), *61*, 1992: 37-41.
23. HAMPL, J. - ŠTĚPÁNEK, J. - FRANZ, J. - SVOBODA, I.: Incorporation of bovine herpesvirus 1 protein subunits into large unilamellar and multilamellar liposomes. Acta vet. (Brno), *61*, 1992: 29-36.
24. POSPÍŠIL, Z. - MENŠÍK, J. - KREJČÍ, J. - ŠTĚPÁNEK, J. - MACHATKOVÁ, M.: Strategie ozdravovacího postupu od infekční bovinní rhinotracheitidy (Strategy of sanation of herds affected by infectious bovine rhinotracheitis). Veterinářství, *42*, 1992: 15-17.
25. PŠIKAL, I.: Praktické možnosti použití enzymatického zmnožení nukleových kyselin - PCR ve veterinární virologii (Practical applications of enzymatic nucleic acid amplification of - PCR in veterinary medicine). Veterinářství, *43*, 1993: 188-190.
26. RODÁK, L. - POSPÍŠIL, Z. - TOMÁNEK, J. - VESELÝ, T. - OBR, T. - VALÍČEK, L.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) in tissue homogenates of the carp, *Cyprinus carpio* L. J. Fisch. Dis., *16*, 1993: 101-111.
27. RŮŽIČKOVÁ, V.: Characteristics of strains of *Staphylococcus aureus* isolated in dairy farms. Vet. Med. - Czech, *39*, 1994: 37-44.
28. RYCHLÍK, I. - ŠIŠÁK, F. - LÁNY, P. - ČERNÍK, J.: Differentiation of *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* by plasmid profile analysis and restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. Vet. Med. - Czech, *38*, 1993: 433-439.
29. SALAJKA, E. - SALAJKOVÁ, Z. - ALEXA, P. - HORNICH, M.: Colonization factor different from K88, 8P41 and 987P in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhoea in pigs. Vet. Microbiol., *32*, 1992: 163-175.
30. ŠESTÁK, K. - IŠA, P.: Současné poznatky o rotavirech se zaměřením na rotaviry prasat (Rotaviruses: A review with regard to porcine rotaviruses). Vet. Med. - Czech, *38*, 1993: 161-186.
31. ŠESTÁK, K. - MUSILOVÁ, J. - KUBÍČEK, O. - ALEXA, P.: Výskyt čtyř různých rotavirových elektroferotypů a některých dalších patogenů způsobujících průjmy prasat v ČSFR (Occurrence of four electrophoretic types of rotavirus, and other agents causing diarrhoea in swine in Czechoslovakia). Veterinářství, *42*, 1992: 125-127.
32. ŠMÍD, B. - VALÍČEK, L. - RODÁK, L. - KUDRNA, J. - MUSILOVÁ, J.: Elektronově mikroskopický průkaz viru epidemické diarrhoey prasat v České republice (Electron microscopic demonstration of porcine epidemic diarrhoea in the Czech Republic). Vet. Med. - Czech, *38*, 1993: 333-341.
33. TURÁNEK, J.: FPLC as the tool for liposome preparation by rapid extrusion method. Analyt. Biochem., in press.

34. TURÁNEK, J. - TOMAN, M. - NOVÁK, J. - KRCHŇÁK, V. - HOŘAVOVÁ, P.: Adjuvant effect of liposomes and adamantylamide dipeptide of entrapped synthetic peptide derived from HIV-1 trans-membrane region glycoprotein GP 41. Immunol. Lett., in press.
35. VALÍČEK, L. - PARAVANOVÁ, A.: Catalogue of animal viruses. Collection of animal pathogenic microorganisms. Brno 1992. 39 pp.
36. VALÍČEK, L. - ŠMÍD, B. - RODÁK, L.: Immunoelectron microscopy of rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) using monoclonal antibodies. Acta Virol., *36*, 1992: 589-591.
37. VALÍČEK, L. - ŠMÍD, B. - VÁHALA, J.: Demonstration of parvovirus in diarrhoeic African cheetahs (*Acinonyx jubatus jubatus* Schreber, 1775). Vet. Med. - Czech, *38*, 1993: 245-249.

NON-INFECTIOUS DISEASES
LACTATION
REPRODUCTION

38. Mechanisms and ways of modulation of resistance of the bovine mammary gland (D. Ryšánek, J. Schlegelová)
39. Alternative methods of mastitis therapy (P. Olejník)
40. Spermatological analyses for functional assessment of ejaculates in farm animals (Z. Věžník)

Selected publications:

41. BABÁK, V. - RYŠÁNEK, D.: Programové vybavení pro zpracování dat do sdružených testů přístrojů FOSSOMATIC v referenční laboratoři (Software for data processing in collaborative trials of Fossomatic 90 instruments in the reference laboratory). Brno, 1993. 7 pp.
42. ČANDERLE, J. - ZRALÝ, Z. - KUMMER, V. - PANÝREK, L.: Ošetření krav s retencí sekundin analogem prostaglandinu cloprostenolem (Treatment of retained placenta in cows with the prostaglandin analogue cloprostenol). Veterinářství, *43*, 1993: 89-90.
43. KOZDERA, A. - RYŠAVÁ, L. - VĚŽNÍK, Z. - RASZYK, J.: The effect of acute and chronic stress on the testosterone production in male mice. J. Physiol. Pharmacol., *43*, 1992: 235.
44. KOZDERA, A. - VĚŽNÍK, Z. - RYŠAVÁ, L.: Average testosterone levels in bulls after GnRH stimulation at breeder bull rearing stations and A. I. stations. Vet. Med. - Czech, *38*, 1993: 129-140.
45. KOZDERA, A. - VĚŽNÍK, Z. - RYŠAVÁ, L. - ŠIŠÁK, M. - ZAJÍC, J.: Evaluation of endocrine function of testes in bulls. J. Physiol. Pharmacol., *43*, 1992: 234-235.

46. KUMMER, V. - ZRALÝ, Z. - ČANDERLE, J. - MAŠKOVÁ, J.: Snížení ztrát v produkci mléka dojnic využitím neantibiotických přípravků k prevenci a léčbě poporodních zánětů dělohy (Reduction of milk production losses by the use on non-antibiotic drugs for prevention and therapy of post-partal metritis in dairy cows). Náš Chov (Praha), *52*, 1992: 298-299.
47. OLEJNÍK, P. - RYŠÁNEK, D.: Současné požadavky v ČR na provoz minimlékáren (Current requirements for the operation of small dairies in the Czech Republic). Zemědělec I a II, 1-2, 1993: 5, 7.
48. RYCHLÍK, I. - KUBÍČEK, O. - HOLČÁK, V. - PAVLÍK, I. - BÁRTA, J.: DNA fingerprinting in *Falconidae*. Vet. Med. - Czech, *39*, 1994: 111-116.
49. RYŠÁNEK, D. - BABÁK, V. - ŠLEHOFEROVÁ, L.: Účelnost a limity nastavování diskriminační úrovně přístrojů FOSSOMATIC 90 (Rationale of and limits for fixing discrimination level in Fossomatic 90 instruments). Vet. Med. - Czech, *39*, 1994: 37-44.
50. RYŠÁNEK, D. - OLEJNÍK, P. - BABÁK, V.: Efektivnost různých způsobů přípravy dojnic k dojení (Effectiveness of various pre-milking routines). Vet. Med. - Czech, *38*, 1993: 15-29.
51. RYŠÁNEK, D. - SCHLEGELOVÁ, J.: Účinnost BR-testu a Intestu při stanovení reziduí chemoterapeutik v syrovém a prezervovaném mléce (Efficacy of BR-Test and Intest in the determination of chemotherapeutic residues in raw and preserved milk). Vet. Med. - Czech, *38*, 1993: 215-222.
52. VĚŽNÍK, Z. - ŠVECOVÁ, D. - RUBEŠ, J. - KOZDERA, A.: Soubor metod k hodnocení pohlavních funkcí býků (Set of methods for assessment of sexual functions in bulls). Pardubice, 1992. 184 pp.
53. ZRALÝ, Z. - KUMMER, V. - ČANDERLE, J. - MAŠKOVÁ, J. - ŠIŠÁK, M.: Využití perorální aplikace estradiolbenzoátu při terapii a prevenci poruch puerperia krav (Prevention and therapy of puerperal disorders in cows by oral treatment with oestradiol benzoate). Veterinářství, *43*, 1993: 214-217.
54. ZRALÝ, Z. - KUMMER, V. - ČANDERLE, J. - RASZYK, J. - ŠIŠÁK, M.: Vliv estrogenů na fagocytární aktivitu krevních leukocytů jalovic a krav (Effects of oestrogens on phagocytic activity of peripheral leukocytes in heifers and cows). Vet. Med. - Czech, *37*, 1992: 65-74.

NUTRITION
ECOTOXICOLOGY
FOOD HYGIENE

55. Investigations of chromosomes and chromosomal disorders in swine and cattle (J. Rubeš, L. Borkovec)
56. Development of methods of diagnosis, therapy and prevention of metabolic disorders resulting from inadequate nutrition in cattle (B. Vojtíšek)

57. Effects on absorption of hazardous chemical elements and further biomedical applications of defined humine substances (I. Herzig, J. Hampl)
58. Detection of microbial contaminants and residues of inhibitory substances in raw materials and foodstuffs of animal origin (V. Růžičková, J. Vyhnálková)
59. Iodine deficiency in dairy cattle and iodine concentration in milk (I. Herzig)
60. Investigations of products of protein degradation in foodstuffs and feedstuffs, and of selected additives to foodstuffs (S. Standara)
61. Identification of species specific proteins in raw and thermally processed meat products (I. Svoboda)
62. Development of computer software for the management of diagnostics and veterinary care (O. Matoušková, K. Hruška)
63. ELISA determination of xenobiotics in environmental and food samples (M. Fránek, V. Kolář)
64. Biochemical screening of aromatic pollutants (M. Machala, J. Turánek)
65. Protection of the food chain from xenobiotics in areas with intensive industrial and agricultural productions (V. Gajdůšková)
66. Relationship between metabolic clearance of steroid hormones and the liver injury (M. Šišák, K. Hruška)
67. Monitoring of exposure of food animals to genotoxic agents in high-risk areas (J. Rubeš, L. Borkovec)
68. Methods of determination of radioactive substances in food and environmental samples (J. Procházka)
69. Detection and assessment of alpha radiation sources (V. Jirásek)
70. Ecotoxicological studies in an area heavily polluted by lignite mining and combustion with regard to animal health (J. Raszyk, H. Dočekalová)

Selected publications:

71. BRUNCLÍK, T. - PROCHÁZKA, J.: Schnelle Erkennung der durch ^{137}Cs kontaminierten Tiere mit Hilfe einer In vivo-Methode (Rapid identification of ^{137}Cs--contaminated animals by an in vivo-method). In: Radiocaesium in Wald und Wild, 1993: 115-123.
72. BRUNCLÍK, T. - VANĚK, A.: Dynamik der Kontamination von in der Gebirgssystemen der Tschechoslowakei lebenden Wildtieren mit Caesium (Dynamics of contamination by caesium of wild animals living in mountain areas of Czechoslovakia). In: Radiocaesium in Wald und Wild, 1993: 124-133.
73. FRÁNEK, M. - HRUŠKA, K. - ŠIŠÁK, M. - DIBLÍKOVÁ, I.: Development of a microcolumn radioimmunoassay for screening of polychlorinated biphenyls in milk and in animal fats. J. Agric. Food Chem., *40*, 1992: 1559-1568.

74. GAJDŮŠKOVÁ, V. - ULRICH, R.: Využití analýzy specifických kongenerů polychlorovaných bifenylů pro kontrolu potravin a surovin živočišného původu (Analysis of specific polychlorinated biphenyl congeners for the examination of raw materials and foodstuffs of animal origin). Vet. Med. - Czech, *37*, 1992: 471-478.

75. CHALUPA, J. - CÍGLER, M. - MATOUŠKOVÁ, O.: Prezentační program SHOW - ideální pomůcka pro výuku, přednášky a demonstraci výsledků (Presentation programme SHOW - an ideal tool for education, lectures and presentation of results). Medisoft, *92*, 1993: 91-92.

76. JANDL, J. - SLADOVNÍK, K.: Přechod radiocesia do králičího masa a jeho exkrece (Transition of radiocaesium into rabbit meat and its excretion). Vet. Med. - Czech, *38*, 1993: 427-432.

77. LUNSKAYA, I. M. - EREMIN, S. A. - EGOROV, A. M. - KOLÁŘ, V. - FRÁNEK, M.: Development of polarization fluoroimmunoassay for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using monoclonal antibodies. Agrochimica, *2*, 1993: 113-118.

78. MACHALA, M.: Cytochromy P450: toxikologický význam jejich stanovení (Cytochromes P450: Toxicological significance of level determination). Vet. Med. - Czech, *38*, 1993: 739-750.

79. MACHALA, M. - ULRICH, R. - HOLOUBEK, I. - ČÁSLAVSKÝ, J. - KOČAN, A. - PETRÍK, J. - CHOVANCOVÁ, J. - BÍLIKOVÁ, K. - FILIP, F. - GAJDŮŠKOVÁ, V.: The effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the measurement of TCDD-like toxic potency in chick embryo livers. In: Proc. 13th Int. Symp. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. 1991: 1215-1222.

80. MACHALA, M. - NEZVEDA, K. - ULRICH, R. - MÁTLOVÁ, L.: Toxicity potential estimation and biochemical monitoring of aromatic contaminants by the measurement of monooxygenase activities in chick embryo liver. In: Ecotoxicology Monitoring, Weiheim 1993: 173-201.

81. MATOUŠKOVÁ, O. - CÍGLER, M. - CHALUPA, J. - HRUŠKA, K.: Statistický a grafický systém STAT Plus verze 1.01 - Uživatelská příručka (Statistic and grafic system STAT Plus Version 1.01 - User's manual). Brno, 1992. 168 pp.

82. MATOUŠKOVÁ, O. - CHALUPA, J. - CÍGLER, M. - HRUŠKA, K.: Statistický a grafický systém STAT Plus (Statistic and grafic system STAT Plus). Medisoft, *92*, 1993: 76-79.

83. PROCHÁZKA, H. - BRUNCLÍK, T. - JANDL, J. - JIRÁSEK, V. - NOVOSAD, J. - HAMPL, J.: Přechody cesia v krátkých potravních řetězcích (Transitions of caesium in short food chains). Vet. Med. - Czech, *35*, 1990: 119-128.

84. PROCHÁZKA, H. - LUKŠ, D. - KOVÁŘ, M.: Hlemýžď jako biologický indikátor radioaktivní kontaminace prostředí (Snails as biological indicators of radioactive environmental contamination). Radioakt. živ. Prostr., *13*, 1990: 189-197.

85. RASZYK, J.: Praktický imunologický kožní test u selat (A practical immunological skin test in piglets). Vet. Med. - Czech, *37*, 1992: 269-279.

86. RASZYK, J. - DOČEKALOVÁ, H. - RUBEŠ, J. - GAJDŮŠKOVÁ, V. - MAŠEK, J. - RODÁK, L. - BARTOŠ, J.: Ekotoxikologické vztahy ve velkovýkrmně prasat lokalizované v oblasti těžby lignitu a tepelné elektrárny (Ecotoxicological relations in a large pig fattening farm located in a lignite mining area and near a solid-fuel power plant). Vet. Med. - Czech, *37*, 1992: 435-448.

87. RASZYK, J. - DOČEKALOVÁ, H. - RUBEŠ, J. - NAVRÁTIL, S. - MAŠEK, J. - RODÁK, L.: Experimentální chronická intoxikace prasat fenylmerkurichloridem (Experimental chronic phenylmercury chloride intoxication in pigs). Vet. Med. - Czech, *37*, 1992: 379-391.

88. RITTICH, B. - STANDARA, S.: Use of the internal and external standard techniques in determinations of amino acids by ion exchange chromatography. Collec. Czech chem. Commun., *57*, 1992: 46-55.

89. RUBEŠ, J. - BORKOVEC, L. - HOŘÍNOVÁ, Z. - URBANOVÁ, J. - PROROKOVÁ, I. - KULÍKOVÁ, L.: Cytogenetic monitoring of farm animals under conditions of environmental pollution. Mutat. Res., *283*, 1992: 199-210.

90. RUBEŠ, J. - URBANOVÁ, J. - BORKOVEC, L. - HARŤANSKÁ, I. - KULÍKOVÁ, L. - HOŘÍNOVÁ, Z.: Cytogenetické vyšetření krav jako bioindikátoru znečištění životního prostředí v okrese Teplice a Prachatice (Cytogenetic examinations of dairy cows as a biological indicator of environmental pollution in the districts Teplice and Prachatice). Čs. Hyg., in press.

91. URBANOVÁ, E.: Zrychlená metoda stanovení psychrotrofních baktérií v syrovém mléce (Rapid method for the determination of psychrotrophic bacteria in raw milk). Vet. Med. - Czech, *38*, 1993: 83-88.

92. URBANOVÁ, E. - VYHNÁLKOVÁ, J. - MALÍKOVÁ, M.: Závislost počtu mezofilních a psychrotrofních baktérií u vzorků z prvovýroby mléka (Relationship between mesophilic and psychrotrophic bacteria counts in raw milk samples collected in dairy farms). Potrav. Vědy, *11*, 1993: 13-19.

93. VOJTÍŠEK, B. - HAMŘÍK, J.: Semikvantitativní stanovení vápníku, anorganického fosforu a hořčíku v moči krav (Semiquantitative determination of calcium, inorganic phosphorus and magnesium in cows urine). Veterinářství, *42*, 1992: 465-466.

94. VRCHLABSKÝ, J.: PCB-Rücksände in Fleischkonchenmehl und technischem Fett. (PCB residues in meat and bone meal and industria fat). Fleischwirtschaft, *73*, 1993: 105-107.

95. VYHNÁLKOVÁ, J. - MAŠEK, J.: Inhibiční účinky některých antikokcidik a chemických prvků (Inhibitory effects of selected anticoccidial drugs and chemical elements). Veterinářství, *42*, 1992: 56-57.

96. VYHNÁLKOVÁ, J. - URBÁNKOVÁ, E. - PALÁSEK, J.: Nálezy inhibičních látek u drůbeže a vzorků separovaného drůbežího masa zjištěné metodou agarové difuze (Inhibitory substances in poultry and separated poultry meat samples as determined by the agar diffusion method). Čs. Hyg., *37*, 1992: 65-74.

SUBJECT INDEX

absorption of toxic elements 57
acute and chronic stress, testosterone 43
adamantylamid dipeptid 34
addition to foodstuff, inhibitory substances 60
adjuvant 17, 34
agar diffusion method 96
A. I. station for bulls 44
alfa radiation 69
amino acid determination 88
antibody to pseudorabies virus 4
anticoccidial drug 95
aromatic pollutant, biochemical screening 64, 80
aromatic hydrocarbons 79
autochtonnous lactacidogenic microflora 15

biochemical monitoring of pollutants 64, 80
biological indicator of radioactive contamination 84, 86
bovine herpesvirus 1 . . . . . 22, 23
bovine virus diarrhoea-mucosal disease 2
breeder bull rearing station 44
BR-Test 51

caesium 72, 83
calcium 93
calicivirus 7, 36
carp virus 26
catalogue animal virus 35
cell cultures 21
chick embryo liver monooxygenase 79, 80
chromatography 88
chromosomal disorders 55, 89, 90
chromosomal DNA 28
chromosome 55
chronic stress 43
clearance of steroid hormones 55
clinical immunology 16

cloprostenol 42
collection of pathogenic microorganisms 35
colonization factor 29
contaminants in raw materials and foodstuffs 58
contamination by caesium 72
cytochromes P450 78
cytogenetic monitoring 89, 90
cytology 37

degradation of protein 60
diarrhoea in pigs 29, 31
differential diagnosis of calicivirus 7
discrimination level in Fossomatic 90 instruments 49
DNA 28, 48
dogs viruses 9

ecotoxicology 70, 86, 89, 90
ejaculate 40, 52
electron microscopy 32, 36, 37
ELISA 26, 63
endocrine function 45
endometritis 46
endonuclease analysis 28
enteritic infection 11, 19
enterotoxigenic *Escherichia coli* 29
environmental pollution 63, 89, 90
enzymatic amplification of nucleid acid 25
epidemiology swine fever 6
Escherichia coli 11, 29
exposure of food animals to genotoxic agents 67
extrusion method for liposomes 33

Falkonidae 48
fat 73, 94
fingerprinting 48
fish viruses 8
fluoroimmunoassay 77
food 63, 67, 68

food chain 65, 83
foodstuff 58, 60
Fossomatic 90 instrument 41, 49
FPLC 33
function test, testosterone production 45

gastrointestinal infections 3, 5
genotoxic agent 67
glycoprotein GP 41 34
GnRH stimulation 44
grafic system 81, 82

haemaglutination 37
hare 7
hazardous chemical elements 57
humine substances 57

immunoelectron microscopy 36, 37
immunogenetic activity 10
immunological diagnosis 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 26
immunological skin test 85
immunology 16
immunostimulant 17
immunostimulating complex (ISCOM) 22
incorporation of protein 23
infections bovine rhinotracheitis 1, 24
inhibitory substances 95, 96
inorganic phosphorus 93
Intest 51
intoxication by mercury 87
iodine deficiency 59
ion exchange chromatography 88
ISCOM 22

lactacidogenic microflora 15
leukocyte 54
lignite mining 70, 86
limit for fixing discrimination level in Fossomatic 90 instruments 49

liposome 23, 33, 34
loss of milk production 46

magnesium 93
mammary gland 38
mastitis 39
meat 4, 61, 94, 96
mesophilic microorganism 92
metabolic clearance of steroid hormones 66
metabolic disorders 56
method for assessment of sexual functions 52
metritis 46
microbial contamination 58
milk 46, 51, 59, 73, 91, 92
monitoring 67, 80, 89, 90
monoclonal antibody 36, 77
monooxygenase 80
mycobacteria 12
Mycoplasma 20, 21

non-antibiotical drug 46
nutrition 56

oestradiol benzoate 53
oestrogens effects 54

paratuberculosis 12
parvovirus 9, 37
pathogenic microorganism 35
PCR 25
phagocytic activity 54
phenylmercury chloride intoxication 87
plasmid 28
pneumonia 20
pollutant 64
polychlorinated biphenyls 73, 74. 94
porcine epidemic diarrhoea virus 32
porcine rotavirus 30

post-partal metritis 46
pre-milking routines 50
preparation of liposomes 33
probiotic 15
prostaglandin 42
protein degradation 60
protein identification 61
Pseudorabies virus 4
psychrotrophic microorganisms 91, 92
puerperium 42, 53

rabbit haemorhagic disease 36
radioactive contamination 68, 69, 71, 72, 83
radiocaesium 76
radioimmunoassay 73
reference laboratory 41
residue of inhibitory substances 51, 58
resistance of mammary gland 38
respiratory infection 13
restriction endonuclease analysis 28
retained placenta 42
rhinotracheitis 1
rotavirus 19, 30, 31

Salmonella enteritidis 28
Salmonella typhimurium 28
salmonellosis 14
screening of toxic contaminants 63, 64, 67, 73, 77, 78, 80
semiquantitative determination of Ca, P, Mg 93
sexual function in bulls 52
skin test 85
snails 84
software 41, 62, 75, 81, 82
species specific proteins 51
spermatological analysis 40
spring viraemia of carp 26
Staphylococcus aureus 27
STAT Plus software 81, 82

statistic software 81, 82
steroid hormones 66
stress 43
swine fever 6
syntetic peptid from HIV-1 34

TCDD-like toxic potency 79
testicle 45
testosteron 43, 44, 45
toxicity potential estimation 80
toxicological relevance 78
tuberculosis 12

veterinary care 62
viral protein 10
virus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 22, 24, 25, 26, 31, 32, 34, 35, 36
virus RHDV 36

xenobiotic 63, 65

^{137}Cs 71
2,4-dichlorophenoxyacetic acid 77

AUTHORS AND PROJECT LAEDERS INDEX
* - authors from collaborating institutes

Alexa, P. 11, 29, 31
Babák, V. 4, 41, 49, 50
Bartoš, J. 86
Bartoš, M. 13
Bílíková, K. * 79
Borkovec, L. 55, 67, 89, 90
Brunclík, T. 71, 72, 83
Chalupa, J. 75, 81, 82
Chovancová, J. * 79
Cígler, M. 75, 81, 82
Čanderle, J 42, 46, 53, 54
Čáslavský, J. * 79
Černík, J. 28
Diblíková, I. 73
Dočekalová, H. 70, 86, 87
Dvořáková, J. 20
Dvořák, R. 19
Egorov, A.M. * 77
Eremin, S.A. * 77
Filip, F. 79
Fischer, O. 21
Franz, J. 10, 19, 22, 23
Fránek, M. 63, 73, 77
Gajdůšková, V. 65, 74, 79, 86
Hampl, J. 10, 22, 23, 57, 83
Hamřík, J. 93
Harťanská, I. * 29
Herzig, I. 57, 59
Holčák, V. 48
Holoubek, I. * 79
Hornich, M. 29
Hořavová. P. 34
Hořínová, Z. 89, 90
Hruška, K. 73, 81, 82
Iša, P. 30
Jandl, J. 76, 83
Jirásek, V. 69, 83
Kočan, A. * 79
Kolář, V. 63, 77, 84
Kozdera, A. 43, 44, 45, 52
Krchňák, V. * 34
Krejčí, J. 17, 18, 24
Kubíček, O. 31, 48
Kudrna, J. 32
Kulíková, L. 89, 90
Kummer, V. 42, 46, 53, 54
Lány, P. 14, 15, 28
Lukš, D. 84
Lunskaya, I. * 77
Machala, M. 54, 78, 79, 80
Machatková, M. 24
Malíková, M. 92
Mašek, J. 86, 87, 95
Mašková, J. 53, 46
Matoušková, O. 62, 81, 82
Mátlová, L. 80
Menšík, J. 24
Musilová, J. 15, 31
Navrátil, S. 87
Nezval, J. 9
Nezveda, K. 80
Novák, J. 34
Novosad, J. 83
Obr, T. 26
Olejník, P. 39, 47, 50
Palásek. J. 96
Panýrek, L. * 42
Paravanová, A. 35
Pavlas, M. 12
Pavlík, I. 12, 48
Petrík, J. 79
Pospíšil, Z. 24, 26

Procházka, H. 83, 84
Procházka, J. 68, 71
Proroková, I. 89
Přikal, I. 2, 19, 25
Raszyk, J. 43, 54, 70, 85, 86, 87
Rittich, B. * 88
Rodák, L. 4, 6, 8, 26, 32, 36, 86, 87
Rozkošný, V. 1, 3
Rubeš, J. 52, 55, 67, 86, 87, 89, 90
Růžičková, V. 27, 58
Rychlík, I. 28, 48
Ryšavá, L. 44, 45, 43
Ryšánek, D. 49, 38, 41, 47, 50, 51
Salajka, E. 29
Salajková, Z. 29
Schlegelová, J. 38, 51
Sladovník, K. 76
Standara, S. 60, 88
Svoboda, I. 23, 61
Šesták, K. 30, 31
Šišák,F. 14, 15, 28
Šišák, M. 53, 54, 73, 45, 66
Šlehoferová, L. * 49
Šmíd, B. 7, 4, 5, 6, 22, 32, 36, 37
Štěpánek, J. 1, 3, 9, 19, 22, 23, 24
Švecová, D. 52
Toman, M. 16, 34
Tománek, J. 26
Turánek, J. 17
Turánek, J. 33, 34, 64
Ulmann, L. 13
Ulrich, R. 74, 79, 80
Urbanová, E. 91, 92, 96
Urbanová, J. 89, 90
Valíček, L. 7, 26, 32, 35, 36, 37
Vaněk, A. 72
Váhala, J. * 37
Veselý, T. 8, 26
Věžník, Z. 40, 43, 44, 52, 45
Vojtíšek, B. 56, 93
Vrchlabský, J. 94
Vyhnálková, J. 58, 92, 95, 96
Zajíc, J. 45
Zendulková, D. 21
Zralý, Z. 42, 46, 53, 54

Prepared by Dr. Soňa Šlosárková

MINIMAL INHIBITION CONCENTRATIONS OF SELECTED ANTIBIOTICS FOR STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

I. Šedivá, P. Olejník, D. Ryšánek

Veterinary Research Institute, Brno

Minimal inhibition concentrations (MIC) of gentamycin (Ge), neomycin (Neo), rifampicin (Rif), ampicillin (Amp), lincomycin (Lin), erythromycin (Ery), and streptomycin (STM) were determined by the agar dilution technique using 46, 130, 131, 125, 140, 139 and 142 strains of *Staphylococcus aureus*, respectively. The strains, selected from the collection of the authors' laboratory, were isolated from mammary gland secretions of cows affected with clinical or subclinical mastitis. The following ranges of MIC (μg/ml) were assessed for the antibiotics under study: Ge 0.125 - 0.50, Neo 0.06 - 0.50, Rif 0.0039 - 0.030, Amp 0.015 - 1.00, Lin 0.25 - 1.00, Ery 0.06 - 0.25, STM 0.50 - 64.0. Modal MIC (μg/ml) were as follows; Ery 0.125 (86%), Lin 0.5 (71.4%), Rif 0.007 (68.7%), Ge 0,25 (56.5%), STM 1.00 (54.2%), Neo 0.25 (53.8%), Amp 0.06 (41.6%). The order of efficiency expressed in MIC 90 (μg/ml) was as follows: Rif (0.015), Ery (0.125), Ge (0.25), Neo (0.25), Amp (0.5), STM (4.0).

minimal inhibition concentration; antibiotics; *Staphylococcus aureus*; mastitis; cattle

Antibiotic therapy of infectious mastitis can be reliable only if it is preceded by assessment of the degree of drug sensitivity or resistance of the isolated causal agent. This statement applies particularly to *S. aureus* as the currently dominant causal agent of mammary gland infections in many countries (Bulletin IDF, 1991). Therefore we decided to test the efficacies of selected antibiotics using our laboratory' s collection of the strains of genus *Staphylococcus*, and to express them in terms of minimal inhibition concentrations (MIC) which provide more objective information than results of the currently used diffusion method.

Determinations of MIC were conducted by Mandell and Vest (1972), Gavan and Barry (1980), Washington and Sutter (1980), Craven et al. (1986), Sanchez et al. (1986,1988) and Dees and Schultz (1990). The published values are summarized in Tab. I. Kurek and Niemczyk (1987) and Škarda and Škardová (1990) published only relative frequencies of sensitive strains as determined by the diffusion method. The

aim of our experiments was to arrange in terms of efficiency the antibiotics available for the treatment of mastitis induced by local strains of *S. aureus*.

MATERIAL AND METHODS

Minimal inhibition concentrations were determined by the agar dilution technique as described by Washington and Sutter (1980). The following drugs were used: Gentamycin (Gentamycin sulfate research grade, Feinbiochemica, Heidelberg, New York, Serva), streptomycin (Streptomycin sulphate, Medexport, USSR), lincomycin (Lincomycin hydrochloride, St. Louis, USA, Sigma Chemical Co.), rifampicin (Ryfampicin 95%, St. Louis, USA, Sigma Chemical Co.), ampicillin (Ampicillin standard, 200991/1, Léčiva Praha), erythromycin (Erythromycin, Boehringer Mannheim GmbH, Germany), neomycin (Bykomycin B 1037, Neomycin sulphate 325 000 I.E., BYK Gulden, Lomberg Chemische Fabrik GmbH Konstanz, Schweiz).

Gentamycin, streptomycin, lincomycin, rifampicin, ampicillin, erythromycin and neomycin were tested using 46, 142, 140, 131, 125, 139 and 130 strains of *S. aureus*, respectively. All the strains were isolated from mammary gland secretions of cows affected with clinical or subclinical mastitis in 1980 through 1992 and kept in the collection of the authors' laboratory. The strains were kept in glycerol broth at -18 °C. Their biological properties were verified every two years before reculturing.

MIC were assessed in 9-cm Petri dishes containing Mueller-Hinton's agar with 5 % of defibrinated sheep blood. Series of twofold dilutions of the antibiotics were prepared and the dilutions were added to the agar to obtain the final concentration range of 128 - 0,0039 μg/ml of the medium. Results of pilot experiments showed that extreme dilutions on either or both ends of the series could be omitted without any loss of relevant information. Therefore the series were limited to ten dilutions, but individual upper and lower limits were set for each antibiotic.

A suspension of *S. aureus* cells was used as the inoculum. Its density was determined haemocytometrically and adapted to approx. 10^4 cells/ml, and 0.001 - 0.002 ml were inoculated onto the plates using a special loop. Eight strains were inoculated in randomly located duplicates onto each plate at distances of 1 cm, and results were read after 16 to 20 hours of incubation at 37 °C. The lowest concentration inhibiting the development of visible colonies was regarded as the minimal inhibition concentration of the respective antibiotic.

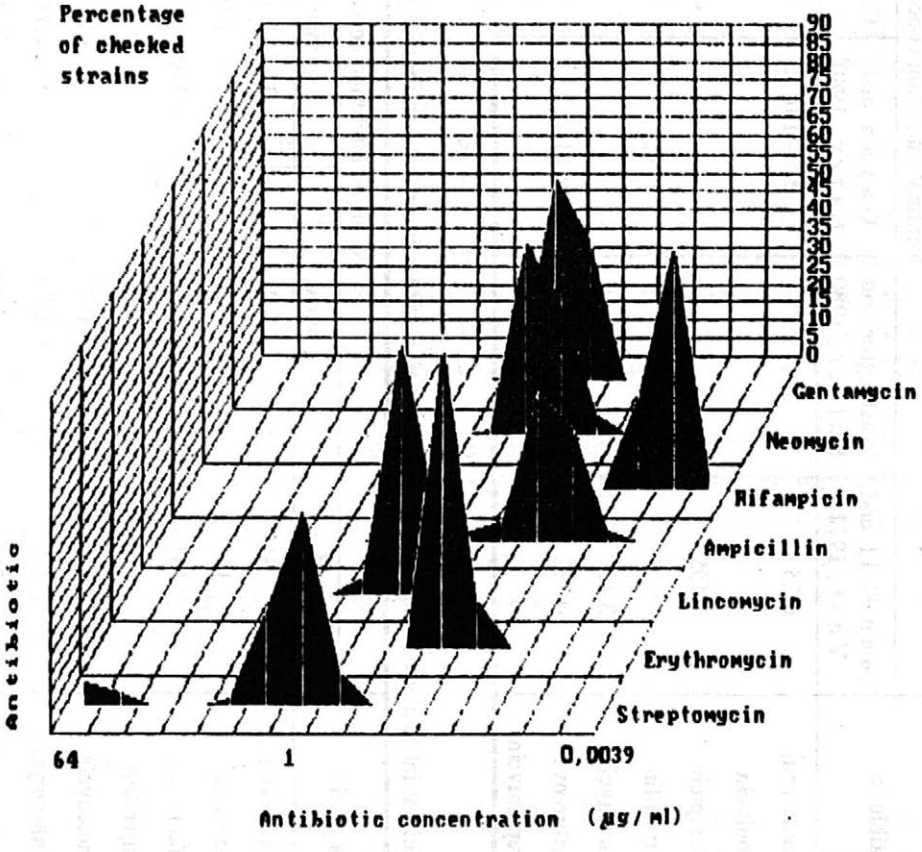
The efficiency of individual antibiotics was characterized by their MIC ranges for the respective set of strains, by mean MIC expressed as weighted arithmetic mean of the values within the respective MIC range, by modal MIC, i.e. the segment of the MIC range inhibiting the highest proportion of strains, and by MIC 90, i.e. the concentration inhibiting 90 or more per cent of the used strains (Craven et al., 1986).

RESULTS

Mean values and ranges of MIC are presented in Tab. II and Fig. 1. The order of the antibiotics in terms of their efficiencies expressed as mean MIC was as follows: rifampicin (0.009), erythromycin (0.12), ampicillin (0.14), neomycin (0.20), gentamycin (0.21), lincomycin (0.47) and streptomycin (6.40). The narrowest ranges were found in gentamycin, lincomycin and erythromycin, and the widest in streptomycin.

Modal MIC values are presented in Fig. 1. The order of the antibiotics in terms of their efficiencies expressed as modal MIC was as follows: erythromycin (0.125; 86 %), lincomycin (0.5; 71.4 %), rifampicin (0.007; 68.7%), gentamycin (0.25; 56.5%), streptomycin (1.0; 54.2%) neomycin (0.025; 53.8%), and ampicillin (0.06; 41.6%). MIC 90 values are given in Tab. II. The order of the antibiotics in terms of their efficiencies expressed as MIC 90 was as follows: rifampicin (0.015), erythromycin (0.125), gentamycin (0.25), neomycin (0.25), ampicillin (0.50), lincomycin (0.50), and streptomycin (4.0).

None of the used strains was resistant to any of the tested antibiotics.



1. Range of minimal inhibition concentrations and modal inhibition concentrations

I. Minimal inhibition concentrations of selected antibiotics for strains of *S. aureus*

Antibiotic	Minimal inhibition concentrations (μg/ml)					
	Mandell and Vest, 1972	Washington and Sutter, 1980	Gavan and Barry, 1980	Craven et al., 1986	Sanchez et al., 1986, 1988	Dees and Schultz, 1990
Gentamycin	6.25	0.2	0.5 - 1.0		2.0	0.25
Neomycin				< 0.25 - 4		
Rifampicin	0.195			< 0.008 - 0.016	0.06	
Ampicillin		0.06	0.5		0.5	
Lincomycin	3.13				0.6	
Erythromycin	0.11	0.12 - 0.25	0.13 - 1	0.25		
Streptomycin	50			0.5 - 32	32	

II. Minimal inhibition concentrations and their characteristics in selected antibiotics for strains of *S. aureus*

Antibiotic	Minimal inhibition concentrations (μg/ml)				
	n^1	mean[2]	range	modal MIC	MIC 90
Gentamycin	46	0.21	0.5 - 0.125	0.25	0.25
Neomycin	130	0.20	0.5 - 0.06	0.25	0.25
Rifampicin	131	0.009	0.03 - 0.0035	0.007	0.015
Ampicillin	125	0.14	1.0 - 0.015	0.06	0.5
Lincomycin	140	0.47	1.0 - 0.25	0.5	0.5
Erythromycin	139	0.12	0.25 - 0.06	0.125	0.125
Streptomycin	142	6.40	64 - 0.5	1.0	4.0

[1]number of strains, [2]weighted arithmetic mean

DISCUSSION

As can be seen in Tab. I, the MIC published by various authors differ from each other. Our results are close to those reported by Craven et al. (1986), especially with regard to neomycin, rifampicin, erythromycin and streptomycin. MIC of gentamycin and ampicillin obtained in our experiments correspond to data published by Washington and Sutter (1980) and that of lincomycin agrees with the results reported by Sanchez et al. (1988).

None of the used strains of *S. aureus* was resistant to any of the tested antibiotics within the used concentration ranges. However, the split distribution of MIC range of streptomycin (Fig. 1) is suggestive of some resistance. A high resistance to streptomycin was reported by authors using the diffusion method for sensitivity tests. Kurek and Niemczyk (1987) reported 5.5, 16.4 and 35.2 per cent, and Škarda and Škardová (1990) 5.2, 4.7 and 14.1 per cent of strains resistant to erythromycin, neomycin and streptomycin, respectively.

The highest efficiency of rifampicin found in our experiments corresponds to data published by Craven et al. (1986), Kurek and Niemczyk (1987) and Sanchez et al. (1988). It should be pointed out, however, that this antibiotic is not convenient for clinical use owing to rapid development of resistance in strains of *S. aureus* (Craven and Anderson, 1981).

Our MIC ranges and modal MIC and MIC 90 values could be compared only with data published by Craven et al. (1986), who tested the antibiotic sensitivity of 106 strains of *S. aureus*. The comparison revealed a similarity of MIC ranges for neomycin, rifampicin and streptomycin, while our MIC range for erythromycin was shifted to lower values. Modal MIC and MIC 90 obtained in our investigations were almost identical with those given by the quoted authors. The only exceptions were a lower modal MIC for streptomycin and a lower MIC 90 for erythromycin found in our laboratory.

It can be concluded that prospective antibiotics for the therapy of *S. aureus* induced mastitis are erythromycin, gentamycin, lincomycin, neomycin and ampicillin. It must be stressed, however, that the results of *in vitro* studies need not correspond fully to the actual therapeutic efficiency which depends on a number of further factors. Our current studies are focused on their identification and assessment of their effects.

References

BULLETIN IDF: Mastitis control. Brussels, International Dairy Federation No 262, 1991: 15-32.

CRAVEN, N. - ANDERSON, J. C.: Therapy of experimental staphylococcal mastitis in the mouse with cloxacillin and rifampin, alone and in combination. Res. Vet. Sci., *31*, 1981: 295-300.

CRAVEN, N. - ANDERSON, J. C. - JONES, T. O.: Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Vet. Rec., *118*, 1986: 290-291.

DEES, C. - SCHULTZ, R. D.: The mechanism of enhanced intraphagocytic killing of bacteria by liposomes containing antibiotics. Vet. Immun. Immunopath., *24*, 1990: 135-146.

GAVAN, T. L.- BARRY, A. L.: Microdilution test producers. In: Manual of Clinical Microbiology. Washington DC, 1980: 459-462.

KUREK, C. - NIEMCZYK, K.: Wzory fagowe gronkowców izolowanych z gruczolów mlekowych krów a ich antybiotykoopornosc. Med. Wet., *43*, 1987: 270-273.

MANDELL, G. L. - VEST, T. K.: Killing of intraleukocytic *Staphylococcus aureus* by Rifampin: In-vitro and in-vivo studies. J. Inf. Diseases, *125*, 1972: 486-490.

SANCHEZ, M. S. - FORD, C. W. - YANCEY JR., R. J.: Evaluation of antibacterial agents in high-volume bovine polymorphonuclear neutrophil *Staphylococcus aureus* intracellular killing assay. Antimicrob. Agents and Chemother., *29*, 1986: 634-638.

SANCHEZ, M. S. - FORD, C. W. - YANCEY JR., R. J.: Evaluation of antibiotic effectiveness against *Staphylococcus aureus* surviving within the bovine mammary gland macrophage. J. Antimicrob. Chemotherapy, *21*, 1988: 773-786.

ŠKARDOVÁ, O. - ŠKARDA, J.: Antibiotic sensitivity of mastitis pathogens. In: Proc. Int. Conf. Mastitis: BURVENICH, C. (ed.): Physiology or Pathology? Gent, Belgium 1990: 111.

WASHINGTON, J. A. - SUTTER, V. L.: Dilution Susceptibility Test: Agar and Macro-Broth ilution Procedures. In: Manual of Clinical Microbiology. Washington DC, 1980: 453-458.

Arrived on 9th Dec. 1993

ŠEDIVÁ, I. - OLEJNÍK, P. - RYŠÁNEK, D. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno):

Minimální inhibiční koncentrace vybraných antibiotik pro kmeny *Staphylococcus aureus*.

Vet. Med. - Czech., *39*, 1994 (4): 159-165.

Cílem předkládané práce byla hierarchizace účinnosti vybraných antibiotik potenciálně použitelných k terapii infekčních mastitid, způsobovaných kmeny *S. aureus* domácí provenience.

Agarovou diluční metodou byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace gentamycinu (Ge), neomycinu (Neo), rifampicinu (Rif), ampicilinu (Amp), lincomycinu (Lin), erythromycinu (Ery) a streptomycinu (STM) na 46, 130, 131, 125, 140, 139, 142 kmenech *S. aureus*, vybraných z vlastní sbírky,izolovaných ze sekretů mléčných žláz skotu, stižených subklinickými a klinickými mastitidami v letech 1980 - 1992.

Pro jednotlivá antibiotika byla zjištěna následující rozpětí MIC (μg/ml): Ge 0,125 - 0, 50; Neo 0,06 - 0,50; Rif 0,0035 - 0,030; Amp 0,015 - 1,00; Lin 0,25 - 1,00; Ery 0,060 - 0,250; STM 0,5 - 64,0 (tab. II, obr. 1).

Byla hodnocena modální MIC, která dosáhla tyto hodnoty (μg/ml): Ery 0,125 (86 %); Lin 0,5 (71,4 %); Rif 0,007 (68,7 %); Ge 0.25 (56,5 %); STM 1,0 (54,2 %); Neo 0,25 (53,8 %); Amp 0,06 (41,6 %) - tab. II, obr. 1.

MIC 90 (μg/ml) dosáhla toto pořadí: Rif 0,0015; Ery 0,125; Ge 0,25; Neo 0,25; Amp 0,5; Lin 0,5; STM 4,0 (tab. II).

Z uvedené studie vyplývá, že pro terapii mastitid, způsobovaných *S. aureus*, jsou perspektivní erythromycin, gentamycin, lincomycin, neomycin a ampicilin. Je však třeba zdůraznit, že závěry předkládané *in vitro* studie nemusejí plně odrážet reálnou terapeutickou účinnost, neboť klinická účinnost je závislá na celé řadě dalších faktorů, které jsou předmětem našeho experimentálního zájmu.

minimální inhibiční koncentrace; antibiotika; *Staphylococcus aureus*; mastitidy; skot

Contact Address:

MVDr. Ivana Š e d i v á , Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321241, fax 05 41211229

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 5/1994 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny tyto příspěvky:

Bouda J., Doubek J., Mužík J., Toth J.: Indukce porodu u krav a její vliv na vývoj biochemických a hematologických ukazatelů v krvi telat

Doubek J., Illek J., Ondráček J.: Preklinická diagnostika metabolických osteopatií u býků ve výkrmu

Fišer A., Láníková A., Novák P.: Plísňová a mikrobiální kontaminace prašného spadu ve stájích pro jalovice a dojnice

Heinová D., Blahovec J., Kováč G.: Nové poznatky o izoenzýmoch laktátdehydrogenázy v krvných sérach ošípaných po porážke

Faixová Z., Várady J.: Prestup aminokyselín cez bachorový epitel oviec: interakcie medzi leucínom a lyzínom

Banykó J.: Polymorfizmus alfas-kazeínov u kozy bielej krátkosrstej bezrohej

Hejlíček K., Treml F.: Epizootologie a patogeneze aviární mykobakteriózy racka chechtavého (*Larus ridibundus*)

INFORMACE - STUDIE - SDĚLENÍ

Pavlásek I.: První případy zjištění spontánní nákazy skotu *Cryptosporidium muris* Tyzzer (1907), 1910 v České republice

USE OF DNA FINGERPRINTING FOR ACCURATE TYPING OF *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*

I. Rychlík, M. Bartoš, K. Šesták

Veterinary Research Institute, Brno

DNA fingerprinting was tested as a method for detailed differentiation of 23 strains of the causal agent of porcine pleuropneumonia - *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The set consisted of twelve reference strains, each representing one serotype, and eleven field strains belonging to serotype 9 which occurs most frequently in the Czech Republic. Nine of the reference strains could be differentiated from each other and from serotypes 1, 9 and 11, but a very close relatedness was demonstrated among the latter three by repeated examinations. Four DNA types were identified among the twelve serotype 9 strains. The findings are discussed within the context of the production and efficiency of industrial and autogenous vaccines.

DNA fingerprinting; porcine pleuropneumonia; autogenous vaccines

Actinobacillus pleuropneumoniae, a gramnegative bacterium of the family *Pasteurellaceae*, is the causal agent of porcine pleuropneumonia and is responsible for considerable economic losses throughout the world (S e b u n y a and S a u n d e r s , 1983). Its first detection in the Czech Republic dates back to 1983 (G o i š and J e ř á b e k , 1985). Of the twelve serotypes described so far, serotype 9 occurs most frequently in the Czech Republic, while serotype 2 is found occasionally and serotypes 1 and 7 rather sporadically (Š k o l o v á , 1990).

Several serological methods, such as indirect fluorescence (R o s e n d a l et al., 1981), indirect haemagglutination (M i t t a l et al., 1983a), complement fixation (G u n n a r s s o n , 1979) or coagglutination (M i t t a l et al., 1983b) tests are available for the identification of the serotypes, but their use is limited to a certain extent by the dominance of serotype 9 in the Czech Republic and by the need of accurate serotype or subserotype identification for vaccine production. Several authors received reasonable results in accurate typing of other bacterial species with DNA fingerprinting (M a r t i n e t t i and A l t w e g g , 1990; S c i e u x et al., 1992; R y c h l í k et al., 1993). Therefore we attempted to analyse selected field strains isolated in the Czech and the Slovak Republics in 1987-93 by DNA typing methods.

At the same time, twelve reference strains were analysed by the same technique to define their serotypes more accurately because cross-reactions among some of

them, affecting the accuracy of serological differentiation, were observed (Rosendal and Mittal, 1985).

MATERIAL AND METHODS

BACTERIAL STRAINS

Twelve reference strains representing serotypes 1 - 12 and 11 field strains of serotype 9 isolated from 11 localities in the Czech Republic were maintained in the yolk medium at -70 °C and propagated in the liquid medium BHI (Brain Heart Infusion) at 37 °C overnight. Inactivation was carried out by repeated washes with buffered saline containing 0.5% formaline.

DNA TECHNIQUES

After washing in sterile PBS, the bacteria were immobilized in 0.8% low-melting agarose and lysed over the weekend at 50 °C in 0.5% SDS, 0.5 mg/ml proteinase K and 50 mM EDTA (Yan et al., 1991). After thorough washes in TE (10 mM TRIS pH 7.5, 1 mM EDTA), the DNA in agarose blocks was digested with the appropriate enzyme (Bam HI, Eco RI, Hind III, Hinf I, Pst I, Amersham). Following digestion, samples were heated for 5 min to 65 °C, extracted with phenol and loaded onto 0.9% agarose gel. Electrophoresis was carried out at 40 V (2 V/cm) for 15 hours. DNA was stained with ethidium bromide and viewed and photographed through an orange filter on UV transilluminator (Sambrook et al., 1989). Restriction fragments were vacuum-blotted onto a nylon membrane (Hybond N, Amersham) and prehybridized and hybridized at 43 °C in Amersham' s hybridization buffer according to the instruction of the manufacturer. Posthybridization washes were done 2 x 5 min in 5 x SSC, 0.1% SDS at room temperature, 2 x 20 min in 1 x SSC, 0.1% SDS at 43 °C and followed by a brief wash in 1 x SSC at room temperature. Exposure times were usually from 1 to 7 days.

OLIGONUCLEOTIDES USED IN STUDY

Oligonucleotide probes were purchased from MiroGene, Czech Republic, and labelled on 3' ends using terminal transferase and ^{32}P dCTP. Sequences of the oligonucleotide probes used in the study were as follows:

$(GTG)_5$: 5' GTG GTG GTG GTG GTG 3'

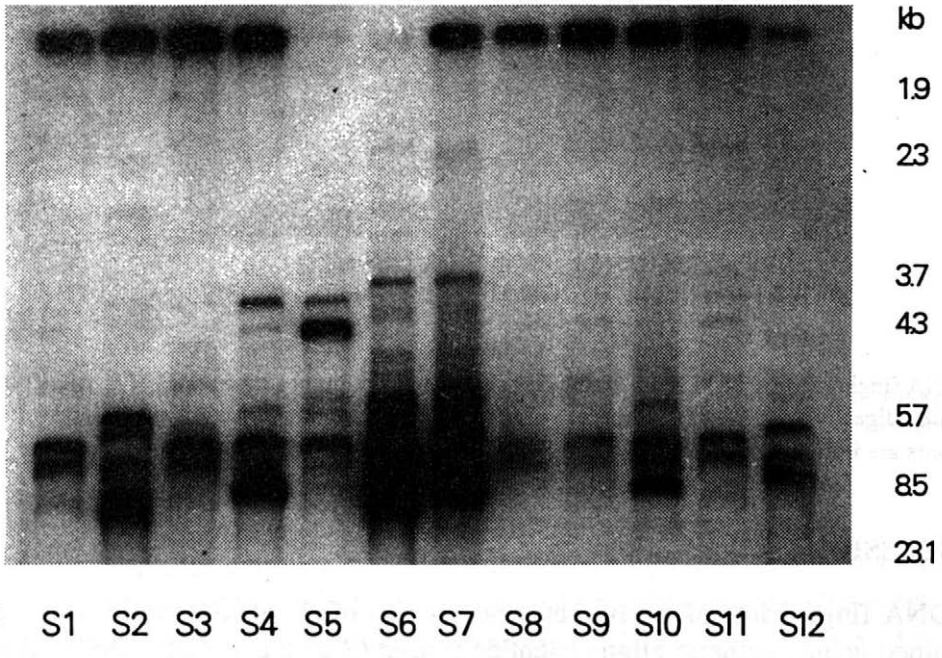
oligoriboprobe : 5' CAG GAT TAG ATA CCC TGG TA 3'

Sequence of oligoriboprobe (oligonucleotide probe complementary to the conservative region of rRNA genes) was chosen according to the sequences published previously (Weisburg et al., 1991).

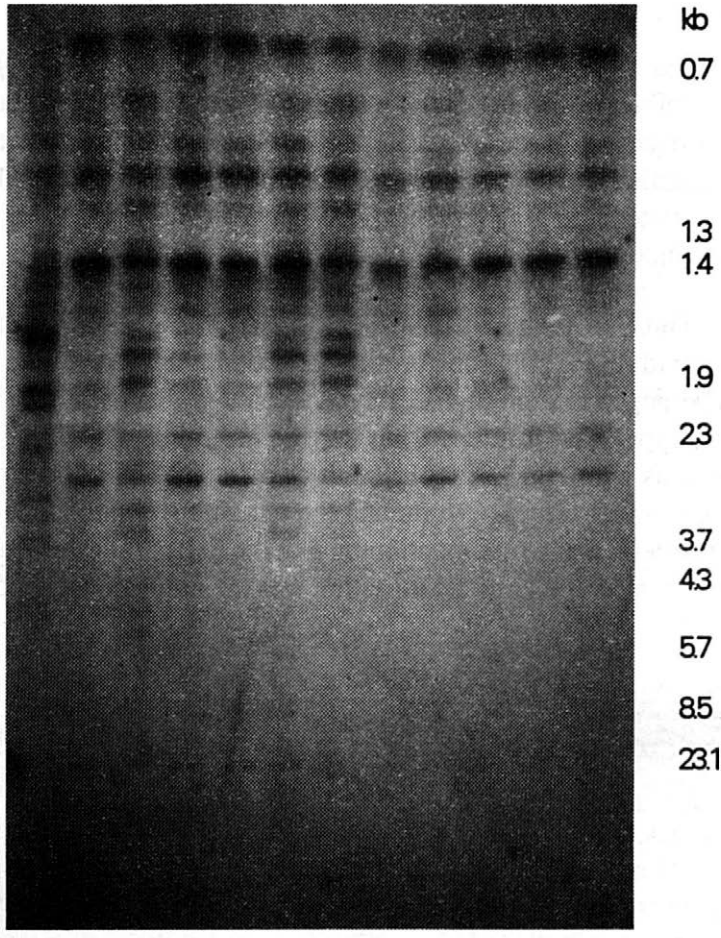
RESULTS

Chromosomal DNA was isolated from 23 strains of *A. pleuropneumoniae* including 12 reference strains and 11 strains of serotype 9, the serotype which occurs most frequently in the Czech Republic. Nine of the twelve reference strains could be distinguished from each other and from serotypes 1, 9 and 11 (Fig. 1), but a very close relatedness was demonstrated between the latter three serotypes by repeated examinations.

Four RFLP types were identified among the reference serotype 9 strain and 11 field strains. Three RFLP types were identifiable after digestion with Hinf I and hybridization with the GTG probe or the oligoriboprobe (Tab. I, Fig. 2, 3). All the field strains belonged to a single RFLP type when digested with Bam HI, Eco RI or Pst I, but the type was different from that of the reference strain. Digestion of serotype 9 strains with Hind III revealed three different DNA fingerprints. One of them belonged to the reference strain and the remaining two to eight and one field strains, respectively. It is worth mentioning that the field strain showing the specific DNA fingerprint after the Hind III digestion was the only one isolated in Slovakia.



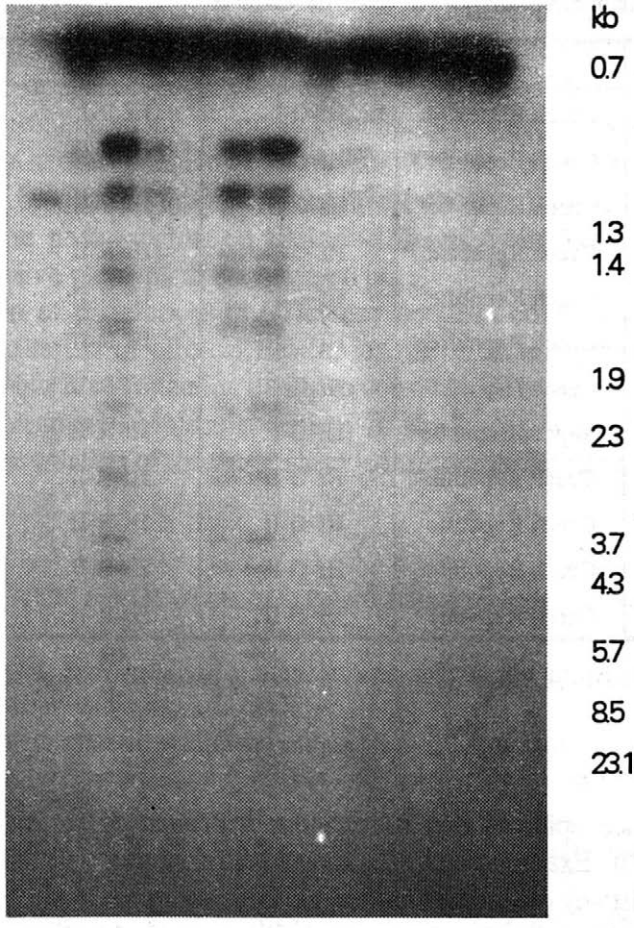
1. DNA fingerprinting of 12 reference strains of *A. plueropneumoniae* (S1 - serotype 1, ...S12 - serotype 12) digested with Hind III and hybridized with radiolabelled oligonucleotide $(GTG)_5$. Molecular weights are indicated



2. DNA fingerprinting of 11 field strains (H2 - H12) and a reference strain (H1) of *A. pleuropneumoniae* digested with Hinf I and hybridized with radiolabelled oligonucleotide $(GTG)_5$. Molecular weights are indicated

DISCUSSION

DNA fingerprints of twelve reference strains of *A. pleuropneumoniae* were obtained using synthetic oligonucleotide probes (S c i e u x et al., 1992; D o l l et al., 1993) in the first series of experiments (Fig. 1). Identical DNA fingerprints were demonstrated by repeated examinations in the serotypes 1, 9 and 11. The remaining reference strains could be distinguished from each other. This finding contributes significantly to accurate differentiation of serotypes. The presence of



3. DNA fingerprinting of 11 field strains (H2 - H12) and a reference strain (H1) of *A. pleuropneumoniae* digested with Hinf I and hybridized with radiolabelled oligoriboprobe. Molecular weights are indicated

common capsular epitopes in some of them (M i l g r o m and S w i e c z y n s k a , 1986) is responsible for a considerable number of cross-reactions among individual serotypes. Such reactions were described among the serotypes 3-6-8, 2-7, 1-9-11, 12-8-7 and 3-6 (Š k o l o v á , 1990). In such cases, DNA fingerprinting may be used as a criterion for the ultimate decision. The homology among serotypes 1, 9 and 11 demonstrated by DNA fingerprinting is an evidence of a very close similarity of their chromosomal DNAs. This fact correlates with the known similarity

I. Review and results of DNA analysis of serotype 9 strains

Strain designation	Locality	Hinf I/GTG	Hinf I/ribo	Hind III/GTG
H1 Standard	Czech Republic	Hf-G-I	Hf-R-I	Hd-G-I
H2 Ořešín	Czech Republic	Hf-G-II	Hf-R-II	Hd-G-II
H3 Dubňany	Czech Republic	Hf-G-III	Hf-R-III	Hd-G-II
H4 Záblatí	Czech Republic	Hf-G-II	Hf-R-II	Hd-G-II
H5 Bílovec	Czech Republic	Hf-G-II	Hf-R-II	Hd-G-II
H6 Živanice	Czech Republic	Hf-G-III	Hf-R-III	Hd-G-II
H7 Těšany	Czech Republic	Hf-G-III	Hf-R-III	Hd-G-II
H8 Jablonica	Slovak Republic	Hf-G-II	Hf-R-II	Hd-G-III
H9 Albrechtice	Czech Republic	Hf-G-II	Hf-R-II	Hd-G-II
H10 Lešany	Czech Republic	Hf-G-II	Hf-R-II	Hd-G-II
H11 Petrovice	Czech Republic	Hf-G-II	Hf-R-II	N.D.
H12 Makov	Czech Republic	Hf-G-II	Hf-R-II	N.D.

Abbreviations: Hf = Hinf I, Hd = Hind III, G = $(GTG)_5$ probe, R = oligoriboprobe, N.D. = not determined

of capsular surface epitopes and subcapsular structures of serotypes 1, 9 and 11 (Mittal, 1990). Examinations of a larger set of strains will allow us to decide whether there exist any differences among the three serotypes at all.

Examinations of the twelve serotype 9 strains revealed two relevant facts:

- the reference strain differs from the field strains isolated currently from infected pig herds;
- three distinct, although very similar, subtypes were identified among the selected strains and identification of others can be expected from examinations of larger sets of strains. Continued research may disclose either dominance of a single subtype, or long-term coexistence of all of them.

The difference between the reference and the field serotype 9 strains is probably due to the long interval between their isolations. Reference strain No. 313 was obtained from the Czechoslovak Collection of Microorganisms in 1983. Since the late eighties, strains Nos. 313 (serotype 9) and 337 (serotype 2) are used as components of commercial vaccines against porcine pleuropneumonia.

Strains isolated more than 10 years ago and used as reference and/or vaccine strains up to the present time may considerably differ from those infecting pig herds currently, and vaccines prepared from them may provide only a limited protection. Our results, although obtained by the examination of only a small set of strains,

seem to confirm this conjecture at least partly. Under such circumstances, the administration of autogenous vaccines prepared from herd-specific strains is preferable. Another approach, motivated by poor growth properties of some field strains, is the production of vaccines containing all subtypes occurring in the respective region at that time. However, merits of vaccines prepared from herd-specific strains can be derived only from empirical observations of the clinical status of animals in the post-vaccination period, differences in feed consumption and findings of adhesive pleuritis in slaughtered pigs.

Quantification of differences in efficiency between commercial and herd-specific vaccines in terms of clinical health, length of fattening period and carcass quality deserves increased attention owing to considerable economic losses caused by porcine pleuropneumonia. Molecular biology methods may become an effective tool for accurate differentiation of its causal agent - *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

References

DOLL, L. - MOSHITCH, S. - FRANKEL, G.: Poly(GTG)5-associated profiles of Salmonella and Shigella genomic DNA. Res. Microbiol., *144*, 1993: 17-24.

GOIŠ, M. - JEŘÁBEK, J.: *Haemophilus pleuropneumonia* of pigs (a review in Czech). Veterinární péče ve velkochovech prasat, č. 1, 1985.

GUNNARSSON, A.: Evaluation of different antigens in the complement-fixation test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*parahaemolyticus*) infections in swine. Amer. J. veter. Res., *40*, 1979: 1564-1567.

MARTINETTI, G. - ALTWEGG, M.: rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing Salmonella enteritidis. Res. Microbiol., *141*, 1990: 1151-1162.

MILGROM, F. - SWIERCZYNSKA, Z.: Are cross-reacting natural antibodies multispecific? Int. Archs. Allergy appl. Immun., *80*, 1986: 200-210.

MITTAL, K. R.: Cross-reactions between *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 and 9. J. clin. Microbiol., *28*, 1990: 535-539.

MITTAL, K. R. - HIGGINS, R. - LARIVIERE, S.: Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. J. clin. Microbiol., *17*, 1983a: 787-790.

MITTAL, K. R. - HIGGINS, R. - LARIVIERE, S.: Detection of type-specific antigens in the lungs of *Haemophilus pleuropneumoniae*-infected pigs by coagglutination test. J. clin. Microbiol., *18*, 1983b: 1355-1357.

ROSENDAL, S. - LOMBIN, L. - DEMOOR, J.: Serotyping and detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* by indirect fluorescent antibody technique. Can. J. comp. Med., *45*, 1981: 271-274.

ROSENDAL, S. - MITTAL, K. R.: Serological cross-reactivity between a porcine *Actinobacillus* strain and *Haemophilus pleuropneumoniae*. Can. J. comp. Med., *49*, 1985: 164-170.

RYCHLÍK, I. - ŠIŠÁK, F. - LÁNY, P.: Differentiation of *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* using plasmid profile analysis and restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. Vet. Med.-Czech, *38*, 1993: 433-439.

SAMBROOK, J. - FRITSCH, E. F. - MANIATIS, T.: Molecular cloning; a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

SEBUNYA, T. N. K. - SAUNDERS, J. R.: *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. J. Amer. veter. Med. Assoc., *182*, 1983: 1331-1337.

SCIEUX, C. - GRIMONT, F. - REGNAULT, B. - GRIMONT, P. A. D.: DNA fingerprinting of *Chlamydia trachomatis* by use of ribosomal RNA, oligonucleotide and randomly cloned DNA probes. Res. Microbiol., *143*, 1992: 755-765.

ŠKOLOVÁ, Z.: Identification and serological differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (in Czech). [CSc thesis.] Brno 1990. University of Veterinary Medicine.

WEISBURG, W. G. - BARNS, S. M. - PELLETIER, D. A. - LANE D. J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacter., *173*, 1991: 697-703.

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: 1068-1072.

Arrived on 6th Jan. 1994

RYCHLÍK, I. - BARTOŠ, M. - ŠESTÁK, K. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno):

Využití DNA fingerprintingu pro přesnou typizaci *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Vet. Med. - Czech, *39*, 1994 (4): 167-174.

Byly ověřeny možnosti využití DNA fingerprintingu pro přesnější a hlubší diferenciaci původce pleuropneumonie prasat *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vyšetřené kmeny zahrnovaly 12 standardních serotypizačních kmenů. Každý reprezentoval jednotlivý sérotyp 1 - 12 a dále pak 11 terénních kmenů serotypu 9, serotypu, který se nejčastěji vyskytuje na území České republiky. Devět referenčních kmenů mohlo být od sebe odlišeno, avšak mezi serotypy 1, 9 a 11 byla opakovaně prokázána značná příbuznost. Mezi 12 kmeny sérotypu 9 (11 terénních kmenů + 1 standardní sérotypizační kmen) byly pozorovány čtyři DNA typy. Individuální DNA typy charakterizovaly jediný kmen pocházející ze Slovenské republiky a standardní serotypizační kmen. Zejména toto zjištění je diskutováno v souvislosti s výrobou a účinností standardních a autogenních vakcín.

DNA fingerprinting; pleuropneumonie prasat; autogenní vakcíny

---

Contact Address:

RNDr. Ivan R y c h l í k, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321241, fax 05 41211229

VLIV HUMÁTU SODNÉHO NA UKLÁDÁNÍ KADMIA V ORGÁNECH KUŘAT*

I. Herzig[1], J. Hampl[1], H. Dočekalová[1], B. Písaříková[1], J. Vlček[2]

[1]*Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno*
[2]*Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové*

U kuřat experimentálně zatížených chloridem kademnatým (0,3 mg $CdCl_2$. 2,5 H_2O na kus a den) byl sledován vliv různých forem aplikace humátu sodného ve volné, resp. liposomální formě, na hladiny kadmia v játrech, ledvinách a svalovině. Hodnoty plochy pod křivkou (AUC), vyjadřující průměrnou koncentraci kadmia ve sledovaných tkáních kuřat (játra, ledviny, svalovina) v daném časovém intervalu (1 - 14 dní), byly vždy vyšší ve tkáních kuřat, která přijímala kadmium, tzn. u skupin K2, P1, P2, P3 a P4 oproti negativní kontrole (K1). Statistická významnost rozdílů byla prokázána v játrech a ledvinách. Ve svalovině ke statisticky významným změnám nedošlo. Současné podávání kadmia a humátu sodného - HuNa (P1), ale i další způsoby aplikace HuNa (P2, P3, P4), hladiny kadmia v játrech, ledvinách i svalovině snížily, statisticky významně jen u skupiny P1 v játrech a ledvinách.

kuře; kadmium; humát sodný; aplikace perorální a subkutánní; liposomy; játra; ledviny; svalovina; biologická dostupnost

Huminové kyseliny jsou slabé organické kyseliny, které vytvářejí koloidní roztoky a mohou chránit sliznici trávicího ústrojí proti působení infekčních a toxických agens. V důsledku chelátové struktury mají schopnost vázat se s řadou toxických látek na nerozpustné a neresorbovatelné komplexy, které mohou být vylučovány střevem (K ü h n e r t aj., 1982).

Z povahy huminových kyselin vyplývá, že dochází k jejich interakci s ionty kovů, při které se uplatňují vlastnosti huminových kyselin jako heterogenního systému polyelektrolytů. Huminové kyseliny jsou přírodní materiál, nemají nežádoucí vedlejší účinky. Bylo prokázáno, že jsou netoxické, nevykazují žádné alergizující, anafylaktické, teratogenní, embryotoxické a kancerogenní účinky (V i s s e r, 1988).

Pozitivní působení huminových kyselin a jejich solí se vysvětlují zvýšením metabolické aktivity v buněčné stěně, zejména zrychlením biologických oxidací, což při vyšším přísunu výživných látek do extracelulární tekutiny může vést ke stimulaci životních procesů.

* Tato práce byla uskutečněna s finanční podporou grantu MPO ČR 322/3110/02/93.

Možnost omezit intoxikace organismů rizikovými chemickými prvky pomocí chelatačních sloučenin je studována již delší dobu. Výsledky a závěry experimentů dosažené s použitím těchto látek při pokusech *in vitro* lze jen obtížně aplikovat na experimenty *in vivo*. Přítomnost mnoha iontů některých kovů v tělních tekutinách a uvnitř buněk, ukládání toxických kovů v různých extracelulárních prostorech, interakce toxických kovů s biologickými ligandy, to vše jsou faktory, které mohou měnit biologický efekt chelatačních látek.

Mezi používané chelatační sloučeniny patří řada látek. Jsou to např. EDTA, DTPA (diethylentriamin pentaoctová kyselina), DF (desferrioxamin) nebo HBED (N-N-bis (2-hydroxybenzyl)-ethylendiamin-N,N dioctová kyselina). Lze sem zařadit také humáty (K l ö c k i n g , 1992).

Kovové ionty reagují s funkčními skupinami kyseliny huminové a vytvářejí komplexy různých typů, např. R COO-M2+ nebo R (COO)2 $M(H_2O)n$; (M = kov). Pro dvojmocnou měď byly popsány oba typy komplexu (M a r i n s k i aj., 1982). Rovněž se mohou uplatnit adsorpční procesy. Množství sorbovaných kovových iontů huminovou kyselinou se mění s pH, stejně jako s koncentrací kovové soli (B e v e r i d g e a P i c k e r i n g , 1980).

Možnost vazby kovů huminovými kyselinami podnítila řadu prací, zaměřených na snížení resp. eliminaci některých nežádoucích kovů (B e v e r i d g e a P i c k e r i n g , 1980; M a r i n s k i aj. 1982), resp. snížení jejich dostupnosti, např. kadmia ze střeva zvířat (H e r z i g aj., 1992).

Ve snaze zvýšit účinnost chelatačních činidel byla zvolena cesta jejich enkapsulace do liposomální formy. Úvodní experimentální práce v tomto směru vykonali R a h m a n aj. (1973), R o s e n t h a l aj. (1975), G u i l m e t t e aj. (1978) a přehlednou práci zveřejnil R a h m a n (1988). Z novějších studií je možno uvést práci autorů B l a n k aj. (1988), kteří doložili, že DTPA aplikovaná v LUV (large unilamellar vesicles) má za následek detoxikaci tkání potkanů od koloidálního ^{89}Yb ve větším rozsahu než po podání této látky samotné. V této studii autoři prokázali, že liposomální povrchový náboj, ať pozitivní či negativní, nemá vliv na výše uvedenou úroveň detoxikace.

Předmětem naší práce bylo u experimentálně zatížených kuřat chloridem kademnatým sledovat vliv různých forem aplikace humátu sodného na hladiny kadmia ve vybraných orgánech. Současně poznat základní farmakokinetiku humátu sodného v organismu kuřat po jeho podání ve volné, resp. liposomální formě.

MATERIÁL A METODY

Do přípravného období pokusu bylo zařazeno 100 jednodenních, sexovaných kuřat brojlerového typu kombinace Hybro. Po dosažení průměrné hmotnosti 800 g bylo zahájeno vlastní pokusné období. Bylo vybráno 96 kuřat, která byla rozdělena do šesti hmotnostně vyrovnaných skupin po 16 kusech.

Schéma pokusu:

1. negativní kontrola: Po dobu 5 dní byl perorálně podáván humát sodný v želatinových tobolkách v množství 0,5 g na kus a den. Tobolka byla podána na kořen jazyku.

2. pozitivní kontrola: Po dobu 5 dní bylo perorálně podáváno kadmium ve formě chloridu kademnatého ($CdCl_2.2,5\ H_2O$) v množství 0,3 mg na kus a den v želatinové tobolce, aplikované na kořen jazyku.

1. pokusná skupina: Po dobu 5 dní bylo podáváno kadmium současně s humátem sodným, obdobně jako u 1. a 2. kontrolní skupiny.

2. pokusná skupina: Kadmium bylo podáváno stejně jako u 1. pokusné skupiny, 5. den pokusu bylo zahájeno pětidenní podávání humátu sodného.

3. pokusná skupina: Po dobu 5 dní bylo podáváno kadmium jako u 1. pokusné skupiny. První den byl jednorázově s kadmiem podán subkutánně humát sodný (500 µg) enkapsulovaný v liposomech.

4. pokusná skupina: Po dobu 5 dní bylo podáváno kadmium. Poslední (5. den) byl jednorázově aplikován subkutánně humát sodný (500 µg) enkapsulovaný v liposomech.

V pokuse byly skupiny kuřat chovány odděleně na hluboké podestýlce. Mikroklimatické podmínky byly pro všechny skupiny shodné a odpovídaly požadavkům na výkrm kuřat. Po celou dobu pokusu byl použit 24hodinový světelný režim. Kuřata byla do 21. dne věku krmena směsí pro výkrm kuřat první fáze, od 21. do 42. dne směsí pro výkrm kuřat druhé fáze. Krmné směsi byly zkrmovány v sypké formě *ad libitum*, volně přístupná byla i pitná voda a písek. V pravidelných týdenních intervalech byly sledovány běžné ukazatele užitkovosti (hmotnost, přírůstky hmotnosti, spotřeba krmných směsí, mortalita apod.).

1., 3., 8. a 14. den po ukončení pokusných zásahů, podle výše uvedeného schematu, byly z každé skupiny utraceny čtyři kusy, provedena pitva, odebrány orgány (játra, ledviny a svalovina) a v nich stanoveny koncentrace kadmia.

Byl použit čistý humát sodný (sodná sůl kyseliny huminové), připravený ve VÚAnCH Ústí n. Labem.

Liposomy byly připraveny metodou „dehydratace-rehydratace" (K i r b y a G r e g o r i a d i s , 1984). Ke stanovení účinnosti enkapsulace humátu sodného byl použit jako radioindikátor humát sodný značeny ^{125}I (H a m p l aj., 1992).

Kadmium bylo stanoveno v játrech, ledvinách a svalovině po mineralizaci v automatickém laboratorním přístroji Apion, metodou plamenové atomové absorpční spektrometrie na přístroji Perkin-Elmer, model 4000.

Výpočet plochy pod křivkou (AUC) orgánových koncetrací kadmia v závislosti na čase byl vypočítán trapezoidální metodou. AUC byla vypočtena pomocí software MW Farm nelineární regresí dvoukompartmentového modelu (V l č e k aj., 1991), relativní vztahy jsou vyjátřeny hodnotou F (%).

Získané hodnoty byly zpracovány běžnými statistickými metodami za využití software Stat Plus (Matoušková aj., 1992). Jsou uváděny průměr (x) se směrodatnou odchylkou (s) a variační koeficient (V).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Plochy pod křivkou (AUC) vyjadřují průměrnou koncentraci kadmia ve sledovaných tkáních kuřat (játra, ledviny, svalovina) nalezené v daném časovém intervalu (1 - 14 dní). Dosažené výsledky jsou uvedeny v tab. I, II a III.

Z výsledků vyplývá, že hodnoty AUC vypočítané z nalezených hladin 1., 3., 8. a 14. den, byly vždy vyšší ve tkáních kuřat, která přijímala kadmium, tzn. u skupin K2, P1, P2, P3 a P4, oproti negativní kontrole (K1). Statistická významnost rozdílů byla prokázána v játrech a ledvinách. Ve svalovině ke statisticky významným změnám nedošlo.

Současné podávání kadmia a HuNa (P1), ale i další způsoby aplikace HuNa (P2, P3, P4), hladiny kadmia v játrech, ledvinách i svalovině snížily, statisticky významně u skupiny P1 v játrech a ledvinách.

Současná perorální aplikace HuNa zřejmě vyvolává tvorbu chelátových vazeb a dochází k ovlivnění dostupnosti kadmia, resp. k jeho zvýšenému vylučování feces.

V případě podávání HuNa až po skončení aplikace kadmia (P2) byly hodnoty kadmia v orgánech nižší, ne však významně. Subkutánní aplikace HuNa ve formě liposomů rovněž nevýznamně snížila hladiny kadmia.

Hladiny kadmia 1., 3., 8. a 14. den po ukončení pokusných zásahů byly nejnižší v játrech u 1. kontrolní skupiny (negativní kontrola), která přijímala jen HuNa. Hodnoty (0,0192 ± 0,0026 až 0,0223 ± 0,0090 mg/kg) můžeme považovat za pozadí, které ovlivňuje hladiny kadmia u všech experimentálních skupin stejně (tab. I).

Pětidenní podávání 0,3 mg kadmia (pozitivní kontrola) statisticky vysoce významně ovlivnilo jeho hodnoty v játrech všech pokusných skupin ve sledovaných časových intervalech. Zjištěné hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,0982 ± 0,0337 až 0,2472 ± 0,0765 mg/kg. Jde o hodnoty řádově vyšší, statisticky významně odlišné od negativní kontroly (tab. I).

První pokusná skupina, přijímající kadmium současně s HuNa, měla hodnoty statisticky významně nižší 3., 8. a 14. den oproti pozitivní kontrole. Současné podání kadmia a humátu sodného omezuje dostupnost kadmia a dochází k jeho nižšímu vstřebání a ukládání v játrech.

Hladiny kadmia 1., 3., 8. a 14. den po ukončení pokusných zásahů byly nejnižší v ledvinách u 1. kontrolní skupiny (negativní kontrola), která přijímala jen HuNa. Hodnoty v rozsahu 0,0358 ± 0,0051 až 0,0520 ± 0,0220 mg/kg můžeme považovat za pozadí, které ovlivňuje hladiny kadmia u všech experimentálních skupin stejně (tab. II).

I. Plocha pod křivkou (AUC) průměrných koncentrací kadmia v játrech v daném časovém intervalu – The field below the curve (AUC) of cadmium average concentrations in liver in the given time interval

Skupina[1]			K1	K2	P1	P2	P3	P4
n			4	4	4	4	4	4
AUC *x*			0,274	2,839^{**A}	1,511^{**A}	1,978^{**A}	2,338^{**A}	2,294^{**A}
s_x			0,0114	0,4486	0,2962	0,4566	0,1281	0,2112
Index			9,6	100,0	53,2	69,7	82,4	80,7
V			4,14	15,80	19,60	23,08	5,48	9,21
min.			0,262	2,181	1,171	1,554	2,167	2,148
max.			0,289	3,145	1,858	2,553	2,474	2,607
Hladiny Cd (mg/kg) v játrech kuřat přijímajících HuNa, Cd a HuNa v liposomech – Cd concentrations (mg/kg) in the liver of chickens receiving HuNa, Cd and HuNa in liposomes								
	n		16	16	16	16	16	16
Den[1]	1	*x*	0,0223	0,0982^{**A}	0,0913	0,1350	0,0982$^{*A}_{*B}$	0,1233^{*A}
		s_x	0,0090	0,0337	0,0485	0,0721	0,0502	0,0379
	3	*x*	0,0200	0,2148^{**A}	0,0982$^{*A}_{*B}$	0,1230$^{**A}_{*B}$	0,1748^{**A}	0,1398^{*A}
		s_x	0,0027	0,0663	0,0342	0,024	0,0204	0,0457
	8	*x*	0,0192	0,2472^{**A}	0,0985$^{*A}_{*B}$	0,1590^{*A}	0,1665^{**A}	0,1793^{**A}
		s_x	0,0026	0,0765	0,0399	0,0802	0,0195	0,0352
	14	*x*	0,0217	0,1933^{**A}	0,1628^{*A}	0,1555$^{**A}_{*B}$	0,1825^{**A}	0,2393^{**A}
		s_x	0,0005	0,0151	0,0687	0,0198	0,0300	0,0679

A = významnost proti negativní kontrole (K1) – significance against negative control (K1)
B = významnost proti pozitivní kontrole (K2) – significance against positive control (K2)
* = $P < 0,05$
** = $P < 0,01$
K1 = negativní kontrola HuNa – HuNa negative control
K2 = pozitivní kontrola Cd – Cd positive control
P1 = Cd + HuNa 5 dní – Cd + HuNa 5 days
P2 = Cd 5 dní, HuNa 5. - 9. den – Cd 5 days, HuNa days 5 - 9
P3 = Cd 5 dní, Li 1. den – Cd 5 days, liposomes day 1
P4 = Cd 5 dní, Li 5. den – Cd 5 days, liposomes day 5

[1]group, [2]day

II. Plocha pod křivkou (AUC) průměrných koncentrací kadmia v ledvinách v daném časovém intervalu – The field below the curve (AUC) of cadmium average concentrations in kidneys in the given time interval

Skupina[1]			K1	K2	P1	P2	P3	P4
n			4	4	4	4	4	4
AUC x			0,544	$8{,}021^{**A}$	$0{,}7085^{**A}_{**B}$	$5{,}500^{**A}$	$6{,}157^{**A}$	$6{,}800^{**A}_{**C}$
s_x			0,0335	0,6997	0,7085	0,7670	0,8762	0,4732
Index			6,8	100,0	54,3	68,6	76,8	84,8
V			6,16	8,72	16,26	13,94	14,23	6,96
min.			0,514	7,017	4,307	4,921	5,197	6,254
max.			0,574	8,519	4,830	6,578	6,964	7,354
Hladiny Cd (mg/kg) v ledvinách kuřat přijímajících HuNa, Cd a HuNa v liposomech – Cd concentrations (mg/kg) in the kidneys of chickens receiving HuNa, Cd and HuNa in liposomes								
	n		16	16	16	16	16	16
Den[2]	1	x	0,0520	$0{,}2825^{*A}$	$0{,}3180^{*A}$	$0{,}3958^{*A}$	$0{,}4833^{*A}$	$0{,}3522^{*A}$
		s_x	0,0220	0,1002	0,1350	0,1719	0,1465	0,1480
	3	x	0,0418	$0{,}5940^{**A}$	$0{,}3015^{*A}$	$0{,}3800^{**A}$	$0{,}4053^{**A}$	$0{,}3910^{*A}$
		s_x	0,0100	0,1806	0,1305	0,0740	0,0248	0,1308
	8	x	0,0373	$0{,}6915^{**A}$	$0{,}2863^{**A}_{**B}$	$0{,}4167^{*A}_{*B}$	$0{,}5333^{**A}$	$0{,}5118^{**A}$
		s_x	0,0057	0,1480	0,0935	0,1288	0,0943	0,1086
	14	x	0,0358	$0{,}5717^{**A}$	$0{,}4170^{*A}$	$0{,}4283^{**A}_{*B}$	$0{,}3603^{**A}_{**B}$	$0{,}6963^{*A}$
		s_x	0,0051	0,0873	0,1389	0,0500	0,0600	0,2329

A = významnost proti negativní kontrole (K1) – significance against negative control (K1)
B = významnost proti pozitivní kontrole (K2) – significance against positive control (K2)
C = významnost mezi P1 a P4 – significance between P1 and P4
* = $P < 0{,}05$
** = $P < 0{,}01$
K1 = negativní kontrola HuNa – HuNa negative control
K2 = pozitivní kontrola Cd – Cd positive control
P1 = Cd + HuNa 5 dní – Cd + HuNa 5 days
P2 = Cd 5 dní, HuNa 5. - 9. den – Cd 5 days, HuNa days 5 - 9
P3 = Cd 5 dní, Li 1. den – Cd 5 days, Li day 1
P4 = Cd 5 dní, Li 5. den – Cd 5 days, Li day 5

[1]group, [2]day

III. Plocha pod křivkou (AUC) průměrných koncentrací kadmia ve svalovině v daném časovém intervalu – The field below the curve (AUC) of cadmium average concentrations in the muscle in the given time interval

Skupina[1]			K1	K2	P1	P2	P3	P4
n			4	4	4	4	4	4
AUC x			0,086	0,114	0,100	0,105	0,100	0,109
s_x			0,0037	0,0146	0,0095	0,0076	0,0091	0,0111
Index			75,4	100,0	87,7	92,1	87,7	95,6
V			4,27	12,82	9,56	7,24	9,04	10,17
min.			0,082	0,095	0,090	0,098	0,090	0,098
max.			0,090	0,127	0,110	0,115	0,110	0,124
Hladiny Cd (mg/kg) ve svalovině kuřat přijímajících HuNa, Cd a HuNa v liposomech – Cd concentrations (mg/kg) in the muscle of chickens receiving HuNa, Cd and HuNa in liposomes								
	n		16	16	16	16	16	16
Den[2]	1	x	0,0068	0,0085^{*A}	0,0095	0,0093	0,0100^{*A}	0,0093^{*A}
		s_x	0,0005	0,0010	0,0024	0,0022	0,0018	0,0017
	3	x	0,0080	0,0095	0,0080	0,0085	0,0085	0,0085
		s_x	0,0008	0,0019		0,0006	0,0013	0,0013
	8	x	0,0055	0,0090^{**A}	0,0068	0,0070^{*A}	0,0070^{*A}	0,0080^{**A}
		s_x	0,0006	0,0016	0,0010	0,0000	0,0008	0,0008
	14	x	0,0055	0,0063	0,0068	0,0075	0,0058	0,0073
		s_x	0,0010	0,0005	0,0010	0,0017	0,0010	0,0019

A = významnost proti negativní kontrole (K1) – significance against negative control (K1)
B = významnost proti pozitivní kontrole (K2) – significance against positive control (K2)
C = významnost mezi P1 a P4 – significance between P1 and P4
* = $P < 0,05$
** = $P < 0,01$
K1 = negativní kontrola HuNa – HuNa negative control
K2 = pozitivní kontrola Cd – Cd positive control
P1 = Cd + HuNa 5 dní – Cd + HuNa 5 days
P2 = Cd 5 dní, HuNa 5. - 9. den – Cd 5 days, HuNa days 5 - 9
P3 = Cd 5 dní, Li 1. den – Cd 5 days, Li day 1
P4 = Cd 5 dní, Li 5. den – Cd 5 days, Li day 5

[1]group, [2]day

Pětidenní podávání kadmia (pozitivní kontrola) statisticky vysoce významně ovlivnilo jeho hodnoty v ledvinách všech pokusných skupin ve sledovaných časových intervalech. Byly nalezeny průměrné hodnoty v rozsahu 0,2825 ± 0,1002 až 0,6915 ± 0,1480 mg/kg. Jde o hodnoty řádově vyšší, statisticky významně odlišné od negativní kontroly (tab. II).

První pokusná skupina, přijímající kadmium současně s HuNa měla hodnoty statisticky významně nižší 3., 8. a 14. den oproti pozitivní kontrole. Současné podání kadmia a humátu sodného omezuje dostupnost kadmia a dochází k jeho nižšímu vstřebání a ukládání v játrech.

Hladiny kadmia ve svalovině 1., 3., 8. a 14. den po ukončení pokusných zásahů byly nejnižší u 1. kontrolní skupiny (negativní kontrola), která přijímala jen HuNa. Hodnoty 0,0055 ± 0,0010 až 0,0080 ± 0,0008 mg/kg můžeme považovat za pozadí, které ovlivňuje hladiny kadmia u všech experimentálních skupin stejně (tab. III).

Pětidenní podávání kadmia (pozitivní kontrola) zvýšilo hladiny kadmia ve svalové tkáni, statisticky významně jen 1. a 8. den. Průměrné hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 0,0063 ± 0,0005 do 0095 ± 0,0019 mg/kg (tab. III).

U první pokusné skupiny, přijímající kadmium současně s HuNa, nebyly nalezeny v koncentraci kadmia významné rozdíly.

Teoreticky může humát sodný ovlivnit množství kadmia v těle tím, že sníží jeho vstřebávání anebo zrychlí jeho vylučování z těla. Pokusili jsme se proto namodelovat situace tak, aby byl humát sodný podáván před a po expozici organismu kadmiem.

Kadmium se významně hromadí v játrech a ledvinách (M a š e k aj., 1991). To potvrzují i naše výsledky. Ve srovnání se svalovou tkání bylo v parenchymatických orgánech nalezeno významně vyšší množství kadmia. Snížení koncentrace kadmia v orgánech, podává-li se současně s humátem sodným, nás vede k předpokladu, že humát sodný ovlivňuje asi především vstřebání kadmia. Schopnost humátu sodného tvořit s kationty cheláty popisuje např. K ü h n e r t aj. (1982) a tyto cheláty se hůř vstřebávají. V jiné naší práci (H a m p l aj., 1994) jsme zjistili, že dostupnost humátu sodného z gastrointestinálního traktu je výrazně nižší. Chelát se pravděpodobně ve větší míře vylučuje feces. Předpoklad, že humát sodný svými chelatačními vlastnostmi snižuje absorpci kadmia je posílen i naším dalším pokusným uspořádáním. Podává-li se totiž humát sodný až po aplikaci kadmia, nebylo v játrech a ledvinách patrné jeho statisticky významné snížení. Také subkutánní aplikace humátu sodného, enkapsulovaného v liposomech, nevedla k statisticky významnému snížení koncentrací kadmia v orgánech. V tomto případě je však třeba vzít v úvahu, že bylo jednorázově aplikováno pouze 500 μg humátu sodného. Další práce v této oblasti budou zaměřeny na ovlivnění hladin rizikových chemických prvků při použití specificky upravených solí kyseliny huminové.

Literatura

BEVERIDGE, A.- PICKERING, W. F.: Influence of humate-solute interactions on aqueous heavy metal ion levels. Wat. Air. Soil. Pollut., *14*, 1980: 171-185.

BLANK, M. L. - BYRD, B. L. - CRESS, E. A. - WASHBURN, C. C. - SNYDER, F: Use of DTPA in heavy metal detoxification. In: Liposomes as Drug Carriers. John Wiley and Sons Ltd. 1988: 497-506.

GUILMETTE, R. A. - CERNY, E. A. - RAHMAN, Y. E.: Pharmacokinetics of the iron chelator desferrioxamine as affected by liposome encapsulation: potential in treatment of chronic hemosiderosis. Life Sci., *22*, 1978: 313-320.

HAMPL, J. - ŠTĚPÁNEK, J. - NEZVAL, J. - ČERNÍK, J. - ŠKROBÁK, F.: Incorporation of sodium humate into liposomes and their penetration through the skin in piglets. In: Abstracts of invited and volunteered papers Humic substances in the global environment and implications in human health. Monopoli, 1992: 332.

HAMPL, J. - HERZIG, I. - VLČEK, J.: Základní farmakokinetická data humátu sodného po aplikaci do organismu kuřat. Vet. Med. - Czech, 1994, v tisku.

HERZIG, I. - DOČEKALOVÁ, H. - MAŠEK, J. - HAMPL, J.: Effect of humin substances on excretion of inorganic xenobiotics and digestibility of nutrients. In: Abstracts of invited and volunteered papers Humic substances in the global environment and implications in human health. Monopoli, 1992: 334.

KIRBY, Ch. - GREGORIADIS, G.: Dehydration-rehydration vesicles a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. Biotechnology, *2*, 1984: 979-984.

KLÖCKING, R.: Humic substances as potential therapeutics. In: Abstracts of invited and volunteered papers Humic substances in the global environment and implications in human health. Monopoli, 1992: 129.

KÜHNERT, M. - FUSCH, V. - GOLBS, S.: Pharmakologisch - toxikologische Untersuchungen an Huminsäuren unter der Zielstellung ihrer oralen Anwendung bei Magen - Darm - Erkrankungen der Nutztiere. In: Proc. Int. Symp, Minks, 1982: 232-243.

MARINSKI, J. A. - GUPTA, S. - SCHINDLER, P.: The interaction of cooper (II) with humic acid. J. Colloid Interface Sci., *89*, 1982: 401-411.

MAŠEK, J. - HERZIG, I. - HRUŠKA, K. aj.: Využití huminových látek k ochraně zdraví zvířat a zlepšení jejich užitkovosti. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, 1991. 26 s.

MATOUŠKOVÁ, O. a kol.: Stat Plus. Uživatelská příručka. Brno, VÚVeL 1992. 168 s.

RAHMAN, Y. E.: Use liposomes in metal poisonings and metal storage disease. In: Liposomes as Drug Carriers. John Wiley and Sons Ltd. 1988: 485-495.

RAHMAN, Y. E. - ROSENTHAL, M. W. - CERNY, E. A.: Intracellular plutonium: Removal by liposome-encapsulated chelating agent. Science, 1973: 300-302.

ROSENTHAL, M. W. - RAHMAN, Y. E. - MORETTI, E. S. - CERNY, E. A.: Removal of polymetric plutonium by DTPA directed into cells by liposome ancapsulation. Radiat. Res., *63*, 1975: 262-274.

VISSER, S. A.: Effects of humic substances on higher animals and man; the possible use of humic compounds in medical treatments. Int. Humic Acid Soc. Meet., Sevilla, 1988. 27 s.

VLČEK, J. - MACEK, K. - SUCHOPÁR, J. - RUDIŠAR, L.: Klinická farmakokinetika. [Skripta.] Praha, Univerzita Karlova 1991. 61 s.

Došlo 22. 2. 1994

HERZIG, I. - HAMPL, J. - DOČEKALOVÁ, H. - PÍSAŘÍKOVÁ, B. - VLČEK, J. (Veterinary Research Institute, Brno; Faculty of Pharmacy of Charles University, Hradec Králové):

The effect of sodium humate on cadmium deposition in the chicken organs.

Vet. Med. - Czech, *39*, 1994 (4): 175-185.

In the chickens with an experimental load of cadmium chloride ($CdCl_2 . 2.5 H_2O$) at a rate of 0.3 mg per bird and day the effect was investigated of various forms of sodium humate administration in free and/or liposomal form as exerted on cadmium concentrations in liver, kidneys and muscle.

The values of the field below the curve (AUC) showing average cadmium concentrations in the investigated tissues of chickens (liver, kidneys, muscle) in the given time interval of 1 - 14 days were higher in all cases in the tissues of chickens which received cadmium, that means in the groups K2, P1, P2, P3 and P4 in comparison with the negative control (K1). Statistical significance of differences was demonstrated in liver and kidneys. No statistically significant changes were observed in the muscle. Simultaneous administration of cadmium and HuNa (P1), and also other methods of HuNa administration (P2, P3, P4) reduced cadmium concentrations in liver, kidneys and muscle statistically significantly only in P1 group in liver and kidneys.

Cadmium concentrations on days 1, 3, 8 and 14 after termination of experimental treatments were lowest in the liver of the 1st control group (negative control), which received HuNa only (Tab. I). Five-day administration of 0.3 mg cadmium (positive control) influenced its values statistically highly significantly in the liver of all experimental groups in all the investigated time intervals (Tab. I). The first experimental group, which received cadmium simultaneously with HuNa had the statistically significantly lower values on days 3, 8 and 14 in comparison with the positive control. Simultaneous administration of cadmium and HuNa reduces cadmium availability and so its absorption and deposition in liver are lower.

Cadmium concentrations on days 1, 3, 8 and 14 after termination of experimental treatments were lowest in the kidneys of chickens of the 1st control group (negative control), which received HuNa only (Tab. II). Five-day cadmium administration (positive control) influenced its values in the kidneys of all experimental groups highly statistically significantly in all the investigated time intervals (Tab. II). The first experimental group which received cadmium simultaneously with HuNa had the statistically significantly lower values on days 3, 8 and 14 in comparison with the positive control. Simultaneous administration of cadmium and HuNa reduced cadmium availability and so its absorption and deposition in liver are lower.

Cadmium concentrations in the muscle on days 1, 3, 8 and 14 after termination of experimental treatments were lowest in the 1st control group (negative control), which received HuNa only (Tab. III). Five-day administration of cadmium (positive control) increased cadmium concentrations in the muscle tissue statistically significantly only on days 1 and 8 (Tab. III). No significant differences in cadmium concentrations were found in the first experimental group receiving cadmium simultaneously with HuNa.

After peroral administration part of sodium humate does not pass into the vascular system but forms complexes with the risky chemical elements directly in the digestive tract. This is also demonstrated by the lower values of biological availability (F). A permanent supply of sodium humate from the extravascular space can be utilized for formation of complexes with the present risky chemical elements and for their subsequent elimination from the organism.

Sodium humate in free form and encapsulated in liposomes passes into the extravascular space after its application to the organism while it is elimiminated from the blood relatively quickly.

A permanent supply of sodium humate from the extravascular space can be utilized for formation of complexes with the present risky chemical elements and for their subsequent elimination from the organism. After peroral administration part of sodium humate does not pass into the vascular system but forms complexes with the risky chemical elements directly in the digestive tract. This is also shown by the lower values of biological availability (F).

chicken; cadmium; sodium humate; liposomes; peroral and subcutaneous administration; liver; kidneys; muscle; biological availability

Contact Address:

MVDr. Ivan H e r z i g , CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321241, fax 05 41211229

KRITÉRIA, PODLE KTERÝCH SE ROZHODUJE O ZAŘAZENÍ VĚDECKÝCH ČASOPISŮ DO CURRENT CONTENTS

(E. G a r f i e l d : Current Comments, *28*, 1990, s. 5-13)

---

1. Citovanost publikovaných článků

- Celkový počet citací článků
- Závažnost (impact) časopisu; hodnotí se indexem (I)

$$I = \frac{\text{počet citací časopisu v určitém roce}}{\text{celkový počet prací zveřejněný v předcházejících dvou letech}}$$

2. Internacionálnost časopisu

- Podle státní příslušnosti prvního autora
- Podle státní příslušnosti autorů, kteří citovali články publikované v časopise

3. Vydavatelská úroveň

- Včasnost a pravidelnost vydávání
- Délka období od dodání rukopisu po zveřejnění
- Dodržování mezinárodních vydavatelských pravidel
  - informovanost titulu časopisu
  - dostatečně popisné tituly článků
  - úplné adresy autorů, včetně čísel telefonů a faxů
- Jazyk, ve kterém je časopis vydáván, dostatečně informativní abstrakt nebo souhrn v angličtině, u neanglicky psaných článků je nezbytný
- Kvalita článků
  - spolehlivost metodiky
  - originalita výsledků
  - úplnost literatury (zda autoři citují široký rozsah významných časopisů)
- Vědecká kvalita autorů i členů redakční rady
  - jak často publikují
  - ve kterých časopisech publikují
  - zda jsou jejich práce citovány

GROWTH AND SURVIVAL OF *SALMONELLA ENTERITIDIS* IN SELECTED EGG FOODS

V. Růžičková

Veterinary Research Institute, Brno

Growth of selected strains of *S. enteritidis* in the white, yolk and liquid whole egg content at 37, 21 and 8 °C and their survival in mayonnaise and sauce Tartare at 37 and 21 °C were investigated. Cell counts of strain No. 2553 rose by 6 - 7 logs and 5 - 6 logs during 24 hours of incubation in the yolk at 37 °C and in liquid whole egg content at 21 °C, respectively. The propagation was inhibited in the white at 37 or 8 °C, but the cell count rose by 1.2 - 1.3 logs after 24 hours of incubation at 21 °C. Four tested strains survived 4 and 2 hours of incubation at 37 or 21 °C in mayonnaise (pH 3.9) and sauce Tartare (pH 4.3), respectively. In samples of mayonnaise with pH adjusted to 5.4, the cell counts rose by 0.6 log after 2 hours of incubation at 37 °C, but, compared with the initial inoculum size, decreased by 0.1 and 0.4 logs after 6 and 24 hours of incubation, respectively. The propagation of all the strains under study was strongly inhibited in peptone water containing 0.4 percent of acetic acid.

Salmonella enteritidis; yolk; white; liquid whole egg content; mayonnaise; sauce Tartare; acetic acid

S. enteritidis has become the most frequent causal agent of human alimentary infections in the Czech Republic and abroad. Its share in the overall incidence of salmonellae in the Czech Republic is estimated up to 80 per cent (K o n e č n ý et al., 1992). Data from abroad agree on the year 1986 as the beginning of dominance of *S. enteritidis* over other *Salmonella* serovars (R o d r i g u e et al., 1990; G e r i g k, 1992; S t e u r, 1993). Eggs, egg products, slaughtered poultry and poultry products are considered the major sources of salmonellae. Further sources include salads, confectionery products, cheeses and numerous ready-to-serve foods (B r y a n, 1992; M a t y á š, 1993).

Effective isolation and identification methods have been developed within intensive long-term studies of salmonellae as the most important causal agents of human alimentary infections. Significant advances have also been achieved in the studies of virulence factors and other mechanisms of pathogenicity. Food protection regulations have been set up and a new approach to food inspection, called Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP), is being implemented. In spite of this

effort and apart from seasonal fluctuations, the incidence of foodborne salmonellosis is rising steadily.

Our investigations concentrated on the ecology of the dominant serovar *S. enteritidis* in selected egg foods because available data on this topic are rather incomplete and sometimes inaccurate.

MATERIAL AND METHODS

The following strains of *S. enteritidis* were used in ecological experiments: No. 2553 (human patient isolate); No. 415 (FT 4 - egg membrane isolate); No. 268 (FT 8 - chick isolate); No. 259 (FT 23 - laying hen isolate); No. 469 (FT 13A - laying hen isolate); No. 1413 (FT 7 - broiler chicken isolate); No. 1 (foodborne isolate); No. 4 (human patient isolate).

Yolk, (pH 6.8, a_w 0.97), white (pH 9.0, a_w 0.96) and liquid whole egg content (pH 7.6, a_w 0.96) prepared from market hen eggs were used as culture media for the propagation of salmonellae at 37, 21 or 8 °C. Commercial mayonnaise (pH 3.9, a_w 0.91, acetic acid content 0.53 - 0.63 per cent) and sauce Tartare (pH 4.3, a_w 0.98, acetic acid content 0.79 per cent) in their original and modified (pH adjusted to 5.4) states were used in survival experiments at 37 and 21 °C.

Minimal inhibition concentration of acetic acid in peptone water for all the eight tested *S. enteritidis* strains was assessed by the test tube dilution method (Urbášková et al., 1985). Two-fold dilution series ranging from 0.025 to 1.6 % were prepared from the stock 3.2% solution in peptone water. The test media were inoculated with *Salmonella* cultures to obtain the densities of 10^6 - 10^7 and 10^7 - 10^8 cells per 1 ml. The bactericidal effect of acetic acid was tested by re-inoculation onto brilliant green agar plates.

pH and water activity of all the media were measured by pH Meter Radiometer, Copenhagen, and a_w-value Analyzer 5808, respectively.

Total salmonella counts were assessed by the brilliant green agar plate method (Czechoslovak Standard ČSN 56 0088), and buffered peptone water (pH 7.2) and Rappaport' s broth were used as resuscitation media.

RESULTS

Growth and propagation characteristics of strain No. 2553 of *S. enteritidis* in liquid whole egg content, the yolk and white at 37 °C are presented in Tab. I. At this temperature which is optimal for the growth, salmonellae propagated very rapidly in liquid whole egg content and in the yolk. Total salmonella counts rose by more than 6 logs in either of the two media after 24 hours of incubation and reached peak values of 10^9 - 10^{10} per 1 ml after 72 hours. No propagation was observed and no salmonellae were detectable in the white after 72 hours of incubation at 37 °C.

I. Propagation of *S. enteritidis* strain No. 2553 in liquid whole egg content, yolk and white at 37 °C

Incubation period (h)	Log TSC per 1 ml		
	LWEC	yolk	white
0	2.7	3.3	2.9
24	9.4	9.5	2.7
48	9.3	9.7	3.0
72	9.7	10.1	-

TSC = total salmonella counts per 1 ml
LWEC = liquid whole egg content

Tab. II shows the results of culture of strain No. 2553 in liquid whole egg content at 21 and 8 °C. Total salmonella counts rose by 3.2 and 3.7 logs after 24 and 48 hours of incubation at 21 °C, respectively. The propagation was very slow at 8 °C, total salmonella counts rising by less than 1 log after 48 hours. As shown in Tab. III, strains Nos. 1, 4 and 415 did not propagate in the white at 37 °C and the cultures became gradually extinct during the incubation. Total salmonella counts of strains Nos. 1 and 4 decreased by 1.7 - 1.8 and 2.3 - 2.6 logs after 48 and 72 hours of incubation, respectively. The corresponding values for strain 415 were 1.1 and 1.2 logs.

II. Growth of *S. enteritidis* strain No. 2553 in liquid whole egg content at 21 and 8 °C

Incubation period (h)	Log TSC per 1 ml	
	21 °C	8 °C
0	5.6	5.7
2	5.5	5.4
4	6.0	5.7
6	5.9	5.6
24	8.8	5.8
48	9.3	6.6

TSC = total salmonella counts per 1 ml

The strains 415 and 268 propagated very slowly in the white when incubated at 21 °C, total salmonella counts increasing by 1.2 - 1.3 and 1.6 - 1.7 logs, after 24 hours and 5 days of incubation, respectively (Tab. IV). The propagation of strains

III. Propagation of *S. enteritidis* strains Nos. 1, 4 and 415 in the white at 37 °C

Incubation period (h)	Log TSC per 1 ml		
	Strain No. 1	Strain No. 4	Strain No. 415
0	4.6	4.8	4.6
6	4.4	4.7	4.7
24	3.9	3.7	4.4
48	2.9	3.0	3.5
72	2.3	2.2	3.4

TSC = total salmonella counts per 1 ml
pH of white (0 h) = 9.0
pH of white (72 h) = 9.3

IV. Growth of *S. enteritidis* strains Nos. 415 (FT 4) and 268 (FT 8), characterised by the log of the total salmonella counts per 1 ml, in the white at 21 and 8 °C

Incubation period	Strain No. 415		Strain No. 268	
	21 °C	8 °C	21 °C	8 °C
0 h	4.7	4.7	4.9	4.6
6 h	5.6	4.7	5.6	4.7
24 h	5.9	4.5	6.2	4.6
48 h	5.5	4.5	6.3	4.5
3 d	NE	4.6	NE	4.4
5 d	6.3	4.2	6.6	4.5
8 d	6.2	4.2	6.4	4.2

TSC = total salmonella counts per 1 ml
NE = not examined

Nos. 415 and 268 ceased on the 8th day of incubation. No propagation of salmonellae was observed in the white at 8 °C and a decrease of total salmonella counts was apparent after 48 hours of incubation.

Data on survival of four strains of *S. enteritidis* in mayonnaise (pH 3.9) at 21 °C is presented in Tab. V. The extinction of the initial inoculum of 10^5 to 10^6 cells was rather rapid. No salmonellae were demonstrable by direct culture onto agar plates after 2 hours of incubation, and resuscitation was necessary to detect surviving cells. No live cells of either of the strains were detectable after 4 to 6 hours of incubation.

V. Survival of 4 selected strains of *S. enteritidis* in mayonnaise at 21 °C

Incubation period (h)	Log TSC per 1 g of the strains Nos.			
	415	259	469	2 553
0	5.5	5.6	5.9	5.6
2	< 1	< 1	< 1	< 1
4	-	< 1	-	-
6	-	-	-	-

TSC = total salmonella counts per 1 ml
pH of mayonnaise = 3.9
Acetic acid content = 0.63 %

Similar results were obtained when strain No. 2553 was inoculated into mayonnaise or sauce Tartare (pH 3.9 and 4.3, respectively) and incubated at the optimal growth temperature of 37 °C (Tab. VI). The initial inoculum of 10^6 - 10^7 cells became extinct after 2 to 4 hours. Some initial growth was observed in samples of mayonnaise and sauce Tartare when pH was adjusted to 5.4 and 4.8, respectively. Total salmonella counts rose by 0.6 log after 2 hours of incubation at 37 °C, but, compared with the initial inoculum size, decreased by 0.1 log after 6 hours and became gradually extinct thereafter.

VI. Survival of *S. enteritidis* strain No. 2553 in mayonnaise and sauce Tartare at 37 °C

Incubation period (h)	Log TSC per 1 g			
	mayonnaise		sauce Tartare	
	M1	M2	T1	T2
0	6.2	6.1	6.7	5.8
2	4.4	6.7	-	5.8
4	-	6.0	-	5.9
6	-	6.0	-	5.8
24	-	5.7	-	3.2

M1: pH 3.9; a_w = 0.91; acetic acid content = 0.53 %
M2: pH 5.4; a_w = 0.91; acetic acid content = 0.11 %
T1: pH 4.3; a_w = 0.98; acetic acid content = 0.79 %
T2: pH 4.8; a_w = 0.98; acetic acid content = 0.23 %

Growth inhibition by acetic acid in peptone water of eight selected strains of *S. enteritidis* is evident from minimal inhibition and bactericidal concentrations given in Tab. VII. None of the strains survived in peptone water containing 0.4 % of acetic acid although the initial density was as high as 10^7 - 10^8 cells per 1 ml.

VII. The estimation of minimal inhibition and bactericidal concentration of the acetic acid (%) for 8 strains of *S. enteritidis* in peptone water

Strains Nos.	Salmonellae counts per 1 ml			
	10^6 - 10^7		10^7 - 10^8	
	MIC	MBC	MIC	MBC
2 553	0.1	0.2	0.2	0.4
415	0.1	0.2	0.2	0.4
268	0.1	0.2	0.2	0.4
259	0.1	0.2	0.2	0.4
469	0.1	0.2	0.2	0.4
1 413	0.1	0.2	0.2	0.4
1	0.1	0.2	0.2	0.4
4	0.1	0.2	0.2	0.4

MIC = minimal inhibition concentration
MBC= minimal bactericidal concentration

DISCUSSION

In our experiments, *S. enteritidis* propagated readily and rapidly in the yolk and liquid whole egg content, especially when incubated at the optimal growth temperature of 37 °C. The propagation in liquid whole eggs at 21 °C was slower, but total salmonella counts rose by more than 3 logs after 24 hours of incubation, this increase providing a sufficient infective dose. The earlier concept that at least 10^5 *Salmonella* cells are necessary to induce clinical disease in man is no longer applicable. Historical analyses have shown that infective doses of salmonellae, except typhus-inducing serovars, range between 10^1 and 10^5 cells (M a t y á š , 1993).

The finding that the propagation of salmonellae in a nutrient-rich medium, such as liquid whole egg content, is considerably reduced at 8 °C is important from the point of view of the application of protective measures. However, some growth was observed after 48 hours of incubation although total salmonella counts rose only by 0.9 log.

Contrary to the yolk and liquid whole egg content, the white proved to be an unsuitable medium for the propagation of salmonellae even at the optimal growth temperature. Some propagation was observed at 21 °C, total salmonella counts increasing by 0.7 - 0.9 and 1.2 - 1.3 logs after 6 and 24 hours of incubation, respectively, and even more marked inhibition was observed at 8 °C. The inoculum remained unchanged and salmonellae only survived during the first 24 hours and became slowly extinct thereafter at the latter temperature. A warning fact however was that, although salmonellae did not propagate in the white at 8 °C, surviving cells without apparent signs of impaired viability were recovered after 8 days of incubation.

All salmonellae incubated at 37 or 21 °C in mayonnaise or sauce Tartare containing 0.5 and 0.7 per cent of acetic acid, respectively, died within 4 hours. The survival was prolonged to 6 - 24 hours when pH of mayonnaise and sauce Tartare was adjusted to 5.4 and 4.8, respectively. Therefore, home-made mayonnaises with lower contents of acetic acid are particularly dangerous. This danger was also stressed by several authors (Perales and García, 1990; Duguid and North, 1991). The content of non-dissociated molecules of organic acids is apparently the decisive factor for the propagation of salmonellae in mayonnaise and mayonnaise-containing foods. The length of exposure to acetic acid is another factor on which the survival of salmonellae depends. Earlier experience has shown that salmonellae can propagate even at pH 4.0. It is also known that the effect of weak organic acids on the content of bacterial cells is more pronounced than that of strong inorganic acids (Silliker et al., 1980).

Our experiments, carried out with eight strains of *S. enteritidis*, have confirmed the fact that the concentration 0.2 - 0.4 per cent of acetic acid stopped the propagation of all salmonellae. The commercial mayonnaises used in our experiments contained 0.53 to 0.63 per cent of acetic acid and this concentration was sufficient to cause the gradual death of salmonellae after 2 hours of exposure. Hence such mayonnaises can be considered safe.

Particular attention must be paid to the following health protective measures: packaging of products must not be mechanically damaged; products must be consumed within the shelf life period declared by the manufacturer; a minimal inhibition period of 2 - 4 hours must be observed when home-made mayonaises are consumed; any risk of secondary contamination of mayonnaise and other egg products by salmonellae or other pathogenic germs and the subsequent propagation must be prevented by correct handling.

References

BRYAN, F. L.: Foodborne infections and intoxications: Contemporary problems and solutions. In: Proc. Congr. Foodborne infections and intoxications. Berlin, 1992: 11-19.

DUGUID, J. P. - NORTH, A. E.: Eggs and *Salmonella* food-poisoning: an evaluation. J. Med. Microbiol., *34*, 1991: 65-72.

GERIGK, K.: WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe. In: Proc. Congr. Foodborne infections and intoxications. Berlin, 1992: 20-25.

KONEČNÝ, S. - RAŠKA, V. - KAŇÁKOVÁ, J. - LÁTOVÁ, J.: Incidence bakterií rodu *Salmonella* se zaměřením na sérovary *S. enteritidis* a *S. typhimurium* v různých komoditách živočišných produktů v letech 1981 až 1991 v České republice. (Incidence of bacteria of genus *Salmonella* with attention to serovars *S. enteritidis* and *S. typhimurium* in various commodities of animal origin in 1981 - 1991 in the Czech Republic). Veterinářství, *42*, 1992: 241-244.

MATYÁŠ, Z.: Actual problems of salmonellosis in Czechoslovakia and abroad. Food Ind., *44*, 1993: 10-14.

PERALES, I. - GARCÍA, M. I.: The influence of pH and temperature on the behaviour of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in home-made mayonnaise. Lett. Appl. Microbiol., *10*, 1990: 19-22.

RODRIGUE, D. C. - TAUXE, R. V. - ROWE, B.: International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? Epidemiol. Infect., *105*, 1990: 21-27.

SILLIKER, J. H. - ELLIOTT, R. P. - BAIRD-PARKER, A. C: - BRYAN, F. L. - CHRISTIAN, J. H. B. - CLARK, D. S. - OLSON, J. C - ROBERTS, T. A.: Microbial Ecology of Foods: Food Commodities. Acad. Press 1980: 92-112.

STEUR, W.: Problems in *Salmonella* carriers in view of public health. Zbl. Hyg., *194*, 1993: 205-213.

URBÁŠKOVÁ, P. - HAUSNEROVÁ , S. - CHALOUPECKÝ, V. - LOCHMANOVÁ, J. - VÝMOLA, F. - ZAHRADNICKÝ, J: Vyšetření pro antimikrobiální terapii (Examination for the Purpose of Antimicrobial Therapy). Praha, Avicenum 1985. 150 p.

Arrived on 16th Feb. 1994

RŮŽIČKOVÁ, V. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno):

Růst a přežívání *Salmonella enteritidis* ve vybraných vaječných potravinách.

Veter. Med. - Czech, *39*, 1994 (4): 187-195.

Byl sledován růst vybraných kmenů *Salmonella enteritidis* ve vaječném žloutku, bílku a melanži při teplotě 37 °C, popř. při 21 a 8 °C. Dále bylo sledováno přežívání salmonel v majonéze a tatarské omáčce při teplotě 37 a 21 °C. Bylo zjištěno, že u kmene 2553 došlo během inkubace 24h/37 °C ve vaječném žloutku a melanži ke zvýšení počtu buněk o 6 až 7 log řádů. Při 21 °C/24 h byly ve vaječné melanži detekovány počty salmonel o jeden řád nižší než při teplotě 37 °C. Ve vaječném bílku byl při 37 a 8 °C růst salmonel inhibován. Při 21 °C/24 g se hustota buněk zvýšila o 1,2 až 1,3 řádu. Čtyři kmeny *S. enteritidis* přežily inkubaci při 37 a 21 °C v majonéze (pH 3,9) maximálně

4 h a v tatarské omáčce (pH 4,3) jen 2 hodiny. V upravené majonéze (pH 5,4) se salmonely pomnožily za 2 h/37 °C o 0,6 log řádu. Za 6 h se počet salmonel zredukoval na hodnotu, která byla o 0,1 log řádu nižší oproti počátečnímu stavu. Odumírání salmonel dále pokračovalo a za 24 h počet přežívajících bakterií klesl oproti výchozímu stavu na hodnotu o 0,4 řádu nižší. V tatarské omáčce (pH 4,8) se inhibice růstu salmonel neprojevila během inkubační doby 6 h, avšak za 24 h se testovaná kultura salmonel zredukovala o 2,6 log řádu. Obsah 0,4 % kyseliny octové v peptonové vodě silně inhiboval růst osmi kmenů *S. enteritidis*. Komerční majonézu lze považovat za bezpečnou potravinu tehdy, jestliže jsou zajištěny tyto podmínky: výrobek obsahuje normou stanovenou koncentraci kyseliny octové, obal výrobku není mechanicky porušen a je-li majonéza konzumována v čerstvém stavu. Z hlediska snížení infekčního rizika u majonéz připravených v domácnostech je významné naše zjištění, že limitující je nejen množství přidané kyseliny octové, ale i čas 2 až 4 h jejího inhibičního působení.

Salmonella enteritidis; vaječný žloutek; bílek; melanž; majonéza; tatarská omáčka; kyselina octová

Contact Address:

RNDr. Vladislava R ů ž i č k o v á , CSc, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321241, fax 05 41211229

ADVERTISEMENT

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

For more detailed information, please contact:

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
attn. ing. Zdeňka Radošová
Ústav zemědělských a potravinářských informací
Slezská 7
120 56 P r a h a 2

POČÍTAČOVÉ NUMERICKÉ IDENTIFIKAČNÍ SYSTÉMY V DIAGNOSTICE BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z ŽIVOČIŠNÝCH SUROVIN

E. Urbanová[1], Z. Páčová[2]

[1]*Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno*
[2]*Česká sbírka mikroorganismů, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno*

Na 80 kmenech gramnegativních fermentujících baktérií, izolovaných ze vzorků syrového mléka v zemědělské prvovýrobě, byly testovány dva komerčně dostupné numerické identifikační systémy (TNW a IDENTI). Oběma bylo shodně zařazeno 77 testovaných kmenů (96,25 %) do bakteriálních rodů. Nejčetněji byly izolovány druhy rodů *Klebsiella* (46,25 %), *Enterobacter* (21,25 %) a *Citrobacter* (16,25 %).

gramnegativní baktérie; diagnostické sety ENTEROtest 1 a 2; numerické identifikační systémy

Zrychlení identifikace baktérií a jistou standardizaci výsledků v klinické, ale i veterinární a potravinářské mikrobiologii přináší využívání komerčních diagnostických setů a zpracování jejich výsledků na počítači. Byla vyvinuta řada komerčních systémů, umožňujících identifikaci za 18-24 h (Cox aj., 1979, 1984; Bruckner aj., 1982; Holmes a Humphry, 1988; O' Hara aj., 1992), u rychlých a plně automatizovaných systémů za 2 - 6 h (Izard aj., 1984; Overman aj., 1985; Freney aj., 1991).

V ČR jsou v současné době používány k diagnostice baktérií především komerční sety vyráběné firmou Lachema, a. s. Brno (ENTEROtest 1 a 2, ENTERO-Rapid, STAPHYtest, STREPTOtest, NEFERMtest). Ke zjednodušení identifikace v rutinních laboratořích pak směřuje i využívání numerických identifikačních systémů, a to buď formou diagnostických seznamů (registrů) nebo počítačových programů. S využitím komerčních diagnostických setů a počítačové techniky se získají přesnější výsledky nejméně o 24 h dříve než u konvenčních metod (Stevenson a Parish, 1986) a finanční náklady na diagnostiku jednoho bakteriálního kmene, jak uvádí Stockner (1981), jsou víc jak o polovinu nižší než u konvenčního stanovení. V současné době je využíváno několik typů numerických systémů pro identifikaci baktérií. Dva komerčně dostupné systémy (TNW a IDENTI) jsme v předchozím období porovnávaly na souboru 176 referenčních sbírkových kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* (Páčová a Urbanová,

1993), reprezentujících 63 druhů, včetně kmenů vzácně se vyskytujících v běžné laboratorní praxi. V této práci jsme pro zhodnocení obou numerických systémů využily bakteriální kmeny izolované na oddělení hygieny potravin ze surovin živočišného původu.

MATERIÁL A METODY

Bylo testováno 80 gramnegativních, oxidáza negativních, fermentujících bakteriálních kmenů izolovaných ze vzorků syrového mléka v zemědělské prvovýrobě. Kmeny byly izolovány z primokultur na Endově, masopeptonovém a krevním agaru (Imuna, HI-Media) při rozdílných kultivačních režimech (37 °C C/24 h, pokojová teplota/3 dny, 7 °C/10 dní). Pro diagnostiku izolovaných gramnegativních baktérií byla použita komerční souprava ENTEROtest 1 a 2 (Lachema, a. s. Brno). Testování bylo prováděno dle doporučení výrobce 24h kulturou izolovaného kmene. Každý kmen byl testován třikrát pro vyloučení chybných výsledků biochemických testů, jako důsledku možných technických nedostatků při provádění testů. Výsledky byly odečítány průběžně po 6h (cukry) a po 24h kultivaci. Byla stanovena rovněž oxidáza, kataláza a hodnocena tvorba žlutého pigmentu.

Identifikace testovaných baktérií byla provedena pomocí dvou identifikačních systémů. IDENTI (dodavatel Z. Svoboda, Jihlava; Lachema a. s., Brno) a TNW (dodavatel Česká sbírka mikroorganismů, Brno) jsou počítačové programy pro numerickou identifikaci gramnegativních baktérií, grampozitivních koků a anaerobních baktérií. Zpracování bylo provedeno přímým vložením výsledků testů ENTEROtestu 1 a 2 (+ = pozitivní, - = negativní) do počítače.

VÝSLEDKY

Z celkového počtu 80 izolovaných gramnegativních baktérií bylo oběma numerickými systémy shodně zařazeno do rodů 77, tj. 96,25 % kmenů. Tři kmeny byly programem IDENTI a TNW zařazeny odlišně (tab. I). U těchto tří kmenů při porovnání výše identifikačního skóre, modálního profilu, *T* - indexu, slovního vyhodnocení TNW programem, dále dle výsledků a zkušeností s biochemickými testy v diagnostickém setu, lze konstatovat, že správné zařazení u kmenů č. 51 a 60 bylo vyhodnoceno systémem TNW (celková úspěšnost identifikace = 98,75 %) a u kmene č. 64 systémem IDENTI (celková úspěšnost identifikace = 97,50 %).

V druhové identifikaci 77 shodně rodově zařazených kmenů byla pouze jedna diskrepance u kmene č. 4 programem IDENTI zařazeném jako *Enterobacter cloacae* a TNW jako *E. hormaechei*. Jde o *E. cloacae*, který byl programem TNW v důsledku falešně negativního výsledku u SCI (Simmons citrát) takto zařazen. Systém IDENTI nemá tuto species zařazenu v matici. Další diskrepance v druhové identifikaci se objevila u kmenů č. 75, 76 a 77, které byly dle výsledků diagnostické-

I. Odlišně identifikované bakteriální kmeny – Differently identified bacterial strains

Kmen číslo[1]	Numerický systém[2]	
	IDENTI	TNW
51	*Serratia marcescens* bio 1	*Cedecea species* 5
60	*Enterobacter agglomerans**	*Serratia marcescens* bio 1
64	*Enterobacter cloacae*	nenalezeno[3]

**Pantoea agglomerans* je v programu IDENTI ještě podle původního řazení v rodě *Enterobacter* – *Pantoea agglomerans* is still in the genus *Enterobacter* in IDENTI program according to original classification

[1]strain no., [2]numerical system, [3]not found

ho setu shodně zařazeny oběma numerickými systémy do *E. amnigenus bio 1* resp. *E. intermedius*. Přes poměrně vysoké identifikační skóre a ohodnocení jako dobrá resp. přijatelná identifikace, byl u nich poměrně nízký modální profil a *T*-index a byly zhodnoceny jako nepříliš typické resp. netypické pro daný taxon. Po ověření výsledků konvenčními testy byly kmeny zařazeny jako typický *E. cloacae*. Chybné zařazení numerickými programy vzniklo na základě falešně negativních reakcí ONPG a SCI v ENTEROtestu.

Z celkem 80 testovaných kmenů bylo identifikováno 37 kmenů (46,25 %) jako rod *Klebsiella*, 17 kmenů (21,25 %) jako rod *Enterobacter*, 13 kmenů (16,25 %) jako rod *Citrobacter*, 4 kmeny (5,0 %) jako rod *Hafnia*, 4 kmeny (5,0 %) jako rod *Escherichia*, 2 kmeny (2,5 %) jako rod *Proteus* a jeden kmen (1,25 %) jako rod *Serratia*, jeden kmen jako rod *Cedecea*, jeden kmen jako rod *Kluyvera*.

Nejčetněji byly identifikovány klebsiely. Zařazeny byly převážně do *Klebsiella pneumoniae* (23,3 %) a *K. oxytoca* (22,1 %). Většina kmenů řazených do *K. pneumoniae* měla však slabší diskriminaci a programem TNW byla hodnocena jako intermediární kmen - rodová identifikace, stejně tak jako jeden kmen *K. planticola*, kde rozlišení je při použití ENTEROtestů velmi nesnadné. Dalšími četnými bakteriemi byly *Enterobacter cloacae* (18,75 %) a *Citrobacter freundii* (13,75 %). Identifikace 80 testovaných gramnegativních baktérií je uvedena v tab. II.

DISKUSE

Vysoké procento správně identifikovaných kmenů koreluje se zahraničními literárními údaji a potvrzuje použitelnost komerčních diagnostických setů pro humánní medicínu k testaci gramnegativních baktérií z potravin a surovin živočišného původu (Pérez aj., 1986). Cox a Mercuri (1979) udávají korelace různých komerčních systémů ke konvenčním u baktérií izolovaných z potravin

II. Rodové a druhové zastoupení v testovaném souboru gramnegativních bakterií – Genus and species representation in the tested set of gramnegative bacteria

Rod[1]	Počet[2]	Procento[3]	Druh[4]	Počet[2]	Procento[3]
Klebsiella	37	46,25	*pneumoniae*	18	22,50
			oxytoca	17	21,25
			planticola	1	1,25
			terrigena	1	1,25
Enterobacter	17	21,25	*cloacae*	15	18,75
			amnigenus bio 1	2	2,50
Citrobacter	13	16,25	*freundii*	11	13,75
			diversus	1	1,25
			amalonaticus	1	1,25
Hafnia	4	5,00	*alvei*	4	5,00
Escherichia	4	5,00	*coli*	3	3,75
			coli inactive	1	1,25
Proteus	2	2,50	*mirabilis*	2	2,50
Serratia	1	1,25	*marcescens* bio 1	1	1,25
Cedecea	1	1,25	*species 5*	1	1,25
Kluyvera	1	1,25	*ascorbata*	1	1,25
Celkem[5]	80 testovaných kmenů[6]				

[1]genus, [2]number, [3]percentage, [4]species, [5]total, [6]80 tested strains

mezi 93 - 99 %. Shodné výsledky (96,9% úspěšnost) dosáhla U r b a n o v á (1989) při hodnocení ENTEROtestů (Lachema) a počítačového identifikačního systému ENTERO u 955 kmenů veterinárního a potravinářského původu.

Dosažené výsledky v této práci jsou naopak mnohem příznivější než u výše zmíněné testace sbírkových kmenů stejnými numerickými systémy (P á č o v á a U r b a n o v á , 1993), které byly správně zařazeny oběma systémy v 84,2 % případů. Tento rozdíl je však zdůvodněn především skladbou použitých sbírkových kmenů (63 testovaných druhů). Při porovnání výsledků identifikace stejných rodů (převážně rody *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Escherichia, Hafnia* apod.) z této a předchozí práce bychom získaly obdobné procento správně identifikovaných kmenů (asi 92 %).

Přestože v práci je srovnávána především úspěšnost identifikace pomocí dvou numerických systémů, je nutno připomenout, že konečný výsledek identifikace

baktérií je především závislý od spolehlivosti výsledků ENTEROtestu 1 a 2. I v této práci se potvrdily diskrepance u testů ONPG, SCI a VPT (Voges-Proskaur test), které snižují úspěšnost identifikace. Výsledky práce potvrzují, že identifikace baktérií zkušeným praktickým mikrobiologem pomocí komerčních diagnostických setů a počítačového zpracování výsledků je přínosem pro zkvalitnění práce v mikrobiologické laboratoři. Bylo prokázáno, že komerční diagnostické testy a numerické identifikační systémy lze dobře využít i pro identifikaci baktérií v potravinářské mikrobiologii. Oba testované numerické systémy (IDENTI a TNW) prokázaly stejnou identifikační schopnost. U programu TNW navíc oceňujeme schopnost slovního zhodnocení dané identifikace a nabídku rozlišujících testů.

Literatura

BRUCKNER, D. A. - CLARK, V. - MARTIN, W.: Comparison of Enteric-Tek with API 20E and conventional methods for identification of *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol., *15*, 1982: 16-18.

COX, N. A. - MERCURI, A. J.: Rapid biochemical testing procedures for *Enterobacteriaceae* in foods. Food Technol., *33*, 1979: 57-62.

COX, N. A. - MERCURI, A. J. - CARSON, M. O. - TANNER, D. A.: Comparative study of Micro-ID, Minitek and conventional methods with *Enterobacteriaceae* freshly isolated from foods. J. Fd Protect., *42*, 1979: 735-736.

COX, N. A. - FUNG, D. Y. C. - GOLDSCHMIDT, M. C. - BAILEY, J. S. - THOMSON, J. E.: Selecting a miniaturized system for identification of *Enterobacteriaceae*. J. Fd Protect., *47*, 1984: 74-76.

FRENEY, J. - HERVE, C. - DESMONCEAUX, M. - ALLARD, F. - BOEUFGRAS, J. M. - MONGET, D. - FLEURETTE, J.: Description and evaluation of the semiautomated 4-hour ATB 32E method for the identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol., *29*, 1991: 138-141.

HOLMES, B. - HUMPHRY, P. S.: Identification of *Enterobacteriaceae* with the Minitek system. J. appl. Bacteriol., *64*, 1988: 151-161.

IZARD, D. - HUSSON, M. O. - VINCENT, P. - LECLERC, H. - MONGET, D. - BOEUFGRAS, J. M.: Evaluation of the four-hour rapid 20E system for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol., *20*, 1984: 51-54.

O' HARA, C. M. - RHODEN, D. L. - MILLER, J. M.: Reevaluation of the API 20E identification system versus conventional biochemicals for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*: A new look at an old product. J. Clin. Microbiol., *30*, 1992: 123-125.

OVERMAN, T. L. - PLUMLEY, D. - OVERMAN, S. B. - GOODMAN, N. L.: Comparison of the API rapid E four-hour system with the API 20E overnight system for the identification of routine clinical isolates of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol., *21*, 1985: 542-545.

PÁČOVÁ, Z. - URBANOVÁ, E.: Identifikace referenčních kmenů střevních baktérií numerickými identifikačními systémy TNW, IDENTI a NIS 86. Českoslov. Epidem., *42*, 1993: 59-62.

PÉREZ, J. L. - BERROCAL, C. I. - BERROCAL, L.: Evaluation of a commercial β-glucuronidase test for the rapid and economical identification of *Escherichia coli*. J. Appl. Bact., *61*, 1986: 541-545.

STEVENS, M. - PARISH, G. T.: Rapid identification of gram-negative bacilli from blood cultures. J. Med. Microbiol., *21*, 1986: 215-218.

STOCKNER, P. K.: Microbiological analysis in the veterinary clinical laboratory. Canine Pract., *8*, 1981: 51-53.

URBANOVÁ, E.: Rychlé testy k detekci bakteriálních kontaminant v potravinářském průmyslu. [Kandidátská disertace.] Brno 1989. 82 s. - Masarykova univerzita. Fakulta přírodovědecká.

Došlo 9. 12. 1994

URBANOVÁ, E. - PÁČOVÁ, Z. (Veterinary Research Institute, Brno; Czech Collection of Microorganisms, Faculty of Science of T. G. Masaryk University, Brno):

Computer numerical identification systems in diagnostics of bacteria isolated from animal raw materials.

Vet. Med. - Czech, *39*, 1994 (4): 197-203.

Acceleration of bacteria identification and certain standardization of results in clinical, and also veterinary and food microbiology is enabled by use of commercial diagnostic sets and computer processing of their results. In the present paper, 80 bacterial strains isolated from animal sources in the department of food hygiene were used for assessment of two numerical identification systems (TNW and IDENTI). They were isolated from primary cultures on End' s, meat-peptone and blood agar (Imuna, HI-Media) under different culture regimes (37 °C/24 h, laboratory temperature/3 days, 7 °C/10 days). A commercial diagnostic set ENTEROtest 1 and 2 (Lachema a.s., Brno, Czech Republic) was used for the purposes of diagnostics of gramnegative fermenting, oxidase-negative bacteria. Testing was performed according to the manufacturer' s instructions by the culture of isolated strain. The test results were read continually after 6-hour (sugars) and 24-hour cultivation. Each strain was tested three times. Additional tests - oxidase, catalase, yellow pigment production.

These commercial numerical identification systems were compared:

- IDENTI (supplied by Z. Svoboda, Jihlava; Lachema a.s., Brno)
- TNW (supplied by the Czech Collection of Microorganisms, Brno)

Out of the total number of 80 isolated gramnegative bacteria 77 (96.25%) strains were, classified into the genera by both numerical systems. This result is in agreement with the percentage of identified strains by means of foreign commercial sets and numerical systems, which ranges from 93 to 99% in bacteria isolated from foods (C o x and M e r c u r i , 1979). The results are better than in the last time testing of collection strains by identical identification systems (P á č o v á and U r b a n o v á , 1993). The difference is particularly due to the composition of tested reference strains.

Programs IDENTI and TNW classified three strains in a different way (Tab. I). It can be stated in these strains after comparison by the level of identification score, modal profile, T-index, verbal evaluation, from experience with the results of biochemical tests of commercial set that correct classification of strains no. 51 and no. 60 was provided

by TNW system (98.75% success rate) and by IDENTI system in strain 64 (97.50% success rate).

Species identification of 77 identically genus-classified strains involved only one discrepancy in strain no. 4, since IDENTI program differently classified it as *E. cloacae* and TNW program as *E. hormaechei*. The strain said is *E. cloacae*, which was classified wrongly by TNW program due to falsely negative SCI (Simmons citrate). IDENTI system does not contain this species in the matrix.

Out of the total of 80 tested strains, 37 strains (46.25%) were identified as the genus *Klebsiella*, 17 strains (21.25%) as the genus *Enterobacter*, 13 strains (16.25%) as the genus *Citrobacter*, four strains (5.0%) as the genus *Hafnia* and *Escherichia*, 2 strains (2.5%) as the genus *Proteus* and one strain (1.25%) as the genus *Serratia*, *Cedecea* and *Kluyvera* (Tab. II).

Klebsiellas were isolated most frequently. They were mostly classified as *Klebsiella pneumoniae* (23.3%) and *K. oxytoca* (22.1%). A majority of the strains identified as *K. pneumoniae* had weaker discrimination characteristics and TNW program assessed it as an intermediary strain - generic identification.

The results of the paper confirm that bacteria identification by means of commercial diagnostic sets and computer processing of results is a contribution to improvement of procedures used in a microbiological laboratory. Both tested numerical systems had the same identification quality.

gramnegative bacteria; diagnostic sets ENTEROtest 1 and 2; numerical identification systems

Contact Address:

RNDr. Eva Urbanová, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321241, fax 05 41211229

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

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with long summaries in English or in English language with summaries in Czech or Slovak.
Subscription to these journals should be sent to the above-mentioned address.

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

PŘEHLEDY

POSTNATÁLNÍ VÝVOJ HORMONÁLNÍCH VZTAHŮ V OSE HYPOTALAMUS - HYPOFÝZA - VARLE U BÝKA

A. Kozdera

Postnatální rozvoj pohlavních funkcí a reprodukčního systému býka, završený pubertou, je nejdůležitější fází vývoje býka z hlediska kvality jeho funkce plemeníka a dárce kvalitního semene v dospělosti. Vývojem hormonálních vztahů v souvislosti s rozvojem pohlavních funkcí a reprodukčního systému býka v prvním roce života se zabývala řada autorů. V tomto období dochází k důležitým změnám v sekreci LH, k multiplikaci Leydigových buněk, diferenciaci a multiplikaci Sertoliho buněk, k rychlému růstu varlat, postupnému zvyšování hladiny sérového testosteronu, k iniciaci spermiogeneze, k zrání osy hypotalamus-hypofýza-varle, k ustálení zpětněvazebných mechanismů a k řadě dalších výrazných změn, které vedou k dovršení puberty.

Základními kameny v reprodukční endokrinologii samců byla izolace a purifikace testosteronu z testikulární tkáně (David aj., 1935) a jeho následné stanovení (Lindner, 1959, 1961). Další rozvoj citlivých RIA metod na rychlé kvantitativní stanovení steroidních a peptidických hormonů v krvi a tkáních způsobil revoluci v endokrinologii. Pro andrology byly obzvláště důležité metody pro stanovení LH (Nisvender aj., 1969), FSH (McNeilly aj., 1976), testosteronu (Falvo a Nalbandov, 1974; Schanbacher a D' Occhio, 1982) a GnRH (Nett a Adams, 1977), které umožnily výzkum široké řady otázek andrologické endokrinologie.

Celé období pohlavního rozvoje mladého býka lze rozdělit do několika etap, které na sebe více či méně plynule navazují. Jedná se o období infantilní, prepubertální, puberty, dospělosti a senia. Z praktického hlediska jsou nejdůležitější první čtyři.

INFANTILNÍ OBDOBÍ

Infantilní období je obdobím relativního klidu pohlavního systému samce. Toto období trvá u býků přibližně do 10 až 12 týdnů a je charakterizováno těmito faktory:

- absence epizodických LH pulzů
- blokáda GnRH sekrece navozená pravděpodobně estradiolem
- relativně vyšší hladiny sérového estradiolu

- omezená sekrece androstendionu nebo testosteronu Leydigovými buňkami a hladinami v séru blízkými nule
- žádná testosteronová reakce po aplikaci exogenního GnRH
- schopnost varletní tkáně produkovat androgeny po stimulaci gonadotropiny *in vitro*
- vyšší hladiny sérového inhibinu
- vyrovnané hladiny FSH s mírným zvýšením ve druhém měsíci, důležitým pro iniciaci spermiogeneze.

Sekrece LH fetální telecí hypofýzou (C h a l l i s aj., 1974) je před narozením nebo krátce po narození potlačena. Infantilní období je u telete charakterizováno absencí epizodických LH pulzů (A m a n n aj., 1986). Infantilní fáze trvá u býků zhruba do 10 až 12 týdnů věku (W i s e aj., 1987), přičemž přibližně od 7 do 10 týdnů věku se objevují LH pulzy, jejichž frekvence a amplituda od 10. týdne zřetelně stoupá. Maxima dosahují pulzační LH výlevy ve 13 týdnech, kdy interval mezi výlevy dosahuje dobu kratší než dvě hodiny. Tím je zahájen přechod z infantilní do prepubertální fáze vývoje, což je fáze, kdy zahajují činnost testikulární funkce býčka (A m a n n a W a l k e r, 1983).

Hypofýza je již ve dvou měsících věku býčků schopna odpovídat výlevem LH na exogenní stimulaci pomocí GnRH (M o n g k o n p u n y a aj., 1975).

Mechanismy, zabraňující v infantilní fázi výlevům LH a startující jeho epizodickou sekreci se snažila objasnit řada autorů. Podle A m a n a a W a l k e r a (1983) dochází v infantilní fázi k estradiolem navozené blokádě GnRH sekrece. Koncentrace sérového estradiolu dosahuje maximální hladiny v 6. týdnu věku býčka a prudce klesá v 10. týdnu. Mezi 6. a 10. týdnem dochází v hypotalamu k poklesu počtu receptorů pro estradiol přibližně na polovinu. Zároveň dochází k estradiolem a možná GnRH navozenému vzestupu koncentrace hypofyzárních GnRH receptorů. Chronická, pulzační aplikace GnRH provedená v infantilní fázi bez pravidelných přirozených LH výlevů, může zvýšit frekvenci a amplitudu uvolňování LH (M i l l e r a A m a n n, 1986).

Kastrace býčků, provedená do 10 týdnů věku neměla žádný vliv na koncentraci LH v séru (W i s e aj., 1987). V období 6 až 9 týdnů tedy LH výlev není inhibován gonadálními faktory. Exogenně podaný estradiol kastrovaným býčkům ve věku 6 až 13 týdnů potlačuje koncentraci LH, počet LH pulzů a růst varlat. Je tedy potenciálním inhibitorem pulzačních LH výlevů.

D e a v e r aj. (1988) popisuje po aplikaci estradiolu býčkům ve věku 7,5 týdnů změny ve funkci hypotalamu, redukci GnRH a narušení syntézy norepinefrinu, což vedlo k signifikantní redukci sekrece gonadotropinů a inhibici testikulárního rozvoje. V období jednoho až 20 týdnů věku býčka může estradiol inhibovat i sekreci FSH (S c h a n b a c h e r aj., 1987) a inhibinu (G o d f r e y aj., 1992).

Infantilní fáze vývoje býčka a počátek fáze prepubertální jsou charakterizovány omezenou sekrecí androstendionu nebo testosteronu Leydigovými buňkami a všeobecně nízkými hladinami v séru. Koncentrace sérového testosteronu se pohybuje v prvním až šestém týdnu věku býčků na úrovni blízké nultého, od desátého týdne se začíná pomalu zvyšovat (A m a n n a W a l k e r, 1983).

K o z u m p l í k (1981) zjistil v plazmě 57 býčků ve věku 47 až 106 dnů starých průměrnou hladinu testosteronu 0,65 ± 0,42 ng/ml. R a w l i n g s a C o o k (1986) zjišťovali hladiny androgenů u býčků od narození do 30 týdnů. Průměrná hladina testosteronu za celé období 30 týdnů byla 0,9 ± 0,08 ng/ml séra. V tomto období jsou testosteron, dihydrotestosteron a androstendion produkovány Leydigovými buňkami varlat a androsteron a 5α-redukované androgeny (biologicky účinné metabolity) jsou pravděpodobně produkty periferního metabolismu androgenů.

M c C a r t h y aj. (1979) prokázali v podmínkách *in vitro* schopnost testikulární tkáně produkovat testosteron a androstendion po stimulaci LH i u varlat býčků ve věku jednoho měsíce. Receptory pro LH a FSH ve varleti narozeného telete a varleti býčka ve věku čtyř měsíců prokázal *in vitro* S c h a n b a c h e r (1979a). Zatímco hladiny sérového testosteronu zůstaly po stimulaci exogenním GnRH in vivo na nízké úrovni, hladiny androstendionu reagovaly signifikantním zvýšením (M o n g k o n p u n y a aj., 1975).

Nízké hladiny testosteronu od 8. do 16. týdne prokázali i M ö s t l aj. (1984). Ve věku 8 až 20 týdnů života býčka je androstendion považován za androgen, jehož produkce varlaty převažuje nad produkcí testosteronu, což potvrdili i M c - C a r t h y aj. (1979). Vzhledem ke krátkému poločasu rozpadu, asi 6 min (M ö s t l aj., 1980), a přes erytrocyty rychlé přeměně androstendionu v slabě účinkující epitestosteron, zkoušeli autoři použít stanovení epitestosteronu jako parametru androstendionové sekrece varlat. Hladiny epitestosteronu v séru býčků dosáhly vrcholu v 16. týdnu (M ö s t l aj., 1984).

Vzestup hladin sérového FSH o 30 % bez pulzačních výlevů popisují u býčků mezi 4. a 32. týdnem věku A m a n n a W a l k e r (1983). Průměrná koncentrace sérového FSH se pohybovala v tomto období od od 17 ng/ml do 22 ng/ml. Výkyvy hladin FSH u býčků v průběhu prvních 9 měsíců života neprokázali ani M c C a r t h y aj. (1979). M i y a m o t o aj. (1989) zjistili ve druhém měsíci věku vůči ostatním měsícům signifikantní zvýšení hladin FSH na 40 ng/ml. Toto zvýšení se u býků podaří zachytit pouze zřídka. Je pravděpodobné, že tento vzestup, který je důležitý pro iniciaci spermiogeneze není závislý na steroidech. Byla zjištěna pozitivní signifikantní korelace mezi sérovým FSH a hladinou sérového inhibinu. Hladiny sérového inhibinu jsou vyšší první čtyři měsíce života býka, potom klesají. Tyto vyšší hladiny sérového inhibinu odrážejí vysoké hladiny inhibinu produkované a sekretované nezralým bovinním varletem. Existuje reálný předpoklad, že

inhibin působí na úrovni předního laloku hypofýzy jako supresor FSH sekrece (Blanc aj., 1980; McNeilly aj., 1988; Kaneko aj., 1993).

Neonatální hemikastrace vede u býčků ke zvýšeným hladinám FSH, testikulární kompenzační hypertrofii a zvýšenému počtu gonadotropních receptorů ve zbylém varleti (Schanbacher aj., 1987). To je pak schopno udržovat normální hladinu testosteronu v krvi (Johnson, 1978). Kompenzační testikulární růst je podle Waltona aj. (1978) způsoben následkem zvýšených hladin FSH působících ve varleti zvýšení počtu Sertoliho buněk. Zvýšení testikulární hmotnosti u mladých beránků po aplikaci FSH popsal Courot (1965). Tento proces může být potlačen aplikací exogenního estradiolu, který pravděpodobně působí na úrovni Leydigových buněk (Schanbacher aj., 1987)

PREPUBERTÁLNÍ OBDOBÍ

Prepubertální období je obdobím nejbouřlivějších změn ve vyvíjejícím se pohlavním systému samce. Toto období navazuje plynule na předchozí infantilní fázi vývoje a tento přechod je charakterizován postupným narůstáním amplitudy i frekvence LH pulzů od 8. do 10. týdne věku býčka a za počátek tohoto období je považován věk 12 týdnů.

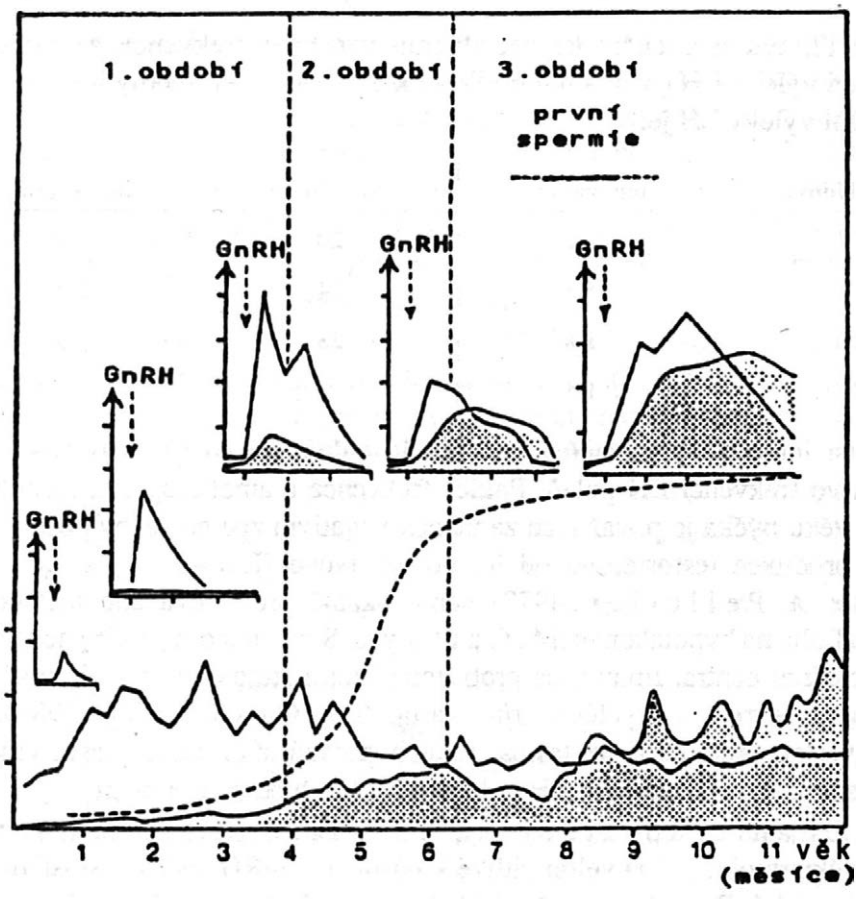
Nejdůležitější události během prepubertálního období u býka:

- iniciace pulzačních výlevů LH
- vlivem LH navozená diferenciace Leydigových buněk se stoupající sekrecí androstendionu jako odpovědí na LH stimulaci
- další diferenciace Leydigových buněk (Wrobel aj., 1988; Wrobel, 1990) vedoucí v LH stimulovanou sekreci testosteronu
- testosteronem indukovaná diferenciace indiferentních podpůrných buněk na Sertoliho buňky a průvodní diferenciace gonocytů na prespermatogonie a A-spermatogonie
- stoupající citlivost hypotalamu a předního laloku hypofýzy na negativní zpětnou vazbu gonadálních faktorů
- kolem 20. týdne postupné snížení frekvence a amplitudy LH výlevů.

Podle charakteru LH vrcholů a odpovědi osy hypofýza - varle na exogenně podaný LH-RH rozdělili Lacroix a Pelletier (1979) toto období do tří fází (obr. 1).

První fáze zahrnuje období do čtyř měsíců věku. Je charakterizována vysokou frekvencí LH pulzů, nulovou testosteronovou odpovědí na přirozené nebo indukované LH pulzy *in vivo* (Mongkonpunya aj., 1975), postupně se zvyšující hypofyzární citlivostí k GnRH a monofázickou odpovědí LH na velké dávky GnRH.

V druhé fázi, ohraničené 4. a 6. měsícem, dochází k pozvolnému poklesu v počtu LH pulzů, objevuje se testosteronová odpověď *in vivo* k přirozeným nebo induko-



1. Vývoj charakteru křivek LH a testosteronu po stimulaci GnRH během prvního roku života býka (L a c r o i x a P e l l e t i e r, 1979)

1. období - před 4. měsícem věku
2. období - mezi 4. a 6. měsícem věku
3. období - po 6. měsíci věku
GnRH - aplikace GnRH
plná čára - LH
čárkovaná čára - hmotnost varlat
tečkovaná plocha - testosteron

vaným LH výlevům, dochází k vzestupu hypotalamo - hypofyzární citlivosti na sexuální steroidy a k multifázické odpovědi LH na velké dávky GnRH.

Třetí fáze, od 6. měsíce věku do puberty, je již charakterizována ustanovením rovnováhy mezi steroidní inhibicí a hypofyzární citlivostí na GnRH, mezi 6. až 8. měsícem ostrým zvýšením hypofyzární citlivosti na GnRH, multifázická odpověď LH na velké dávky GnRH přetrvává.

M o n g k o n p u n y a aj. (1975) potvrdili výlev LH po aplikaci GnRH u dvou, čtyř a šestiměsíčních býčků. Varlata těchto býčků jsou schopna syntézy androstendionu po aplikaci GnRH, ale odpovědi produkcí testosteronu až v šesti měsících.

Kolem 12. týdne dochází ke zřetelnému vzestupu frekvence a amplitudy spontánních výlevů LH (A m a n n a W a l k e r , 1983). Průměrný interval mezi spontánními výlevy LH je:

věk (týdny)	interval (h)	věk (týdny)	interval (h)
4	25,0	20	2,0
8	5,7	24	2,4
12	1,8	28	2,9
16	1,5		

Nejkratší interval byl naměřen ve věku 16 týdnů, od 20 týdnů dochází opět k poklesu ve frekvenci LH pulzů. Pokles frekvence a amplitudy LH vrcholů po 20. týdnu věku býčka je považován za účinek negativní zpětné vazby postupně se zvyšující produkce testosteronu od 18. do 20. týdne (R a w l i n g s aj., 1978; L a c r o i x a P e l l e t i e r , 1979) nebo lokálně produkovaného metabolitu, např. estradiolu, na hypotalamus (Mc C a r t h y a S w a n s o n , 1976) nebo vyšší neuroendokrinní centra. Imunizace proti gonadálním steroidům navodí zvýšenou gonadotropní sekreci a zrychlený růst varlat (D ' O c c h i o aj., 1987). Od 24. týdne varlata produkují více testosteronu, hypofyzární produkce LH se vrací na nízkou hladinu, klesá frekvence LH výlevů a bazální hladina LH klesá.

Podle C h a n t a r a p r a t e e p a a T h i b i e r a (1979) je před sedmým měsícem věku uvolnění LH velmi citlivé k působení GnRH, avšak testosteronová odpověď je nízká. Po sedmém měsíci hladina LH zůstává po stimulaci na stejné úrovni a stoupá hladina testosteronu jako odpověď.

Epizodický charakter LH sekrece je považován za nezbytný pro normální fyziologický vývin testikulárních funkcí u býka (K a r g aj., 1976; S c h a m s aj., 1978; S c h a n b a c h e r , 1979b). Vzestup ve frekvenci pulzačních výlevů LH s maximem v 16 týdnech je následován v průběhu prepubertálního období změněnou testikulární steroidogenezí, stoupajícími cirkulačními hladinami testosteronu, iniciací testikulárního růstu, diferenciací a proliferací Sertoliho buněk a nástupem spermiogeneze (A m a n n a S c h a n b a c h e r , 1983).

Androstendion, predominantní prepubertální testikulární androgen, je zjistitelný v séru býka ve vyšších koncentracích 8., 12. a 16 týden (A b d e l , M a l a k a T h i b i e r , 1979; Mc C a r t h y aj., 1979). Testikulární koncentrace jsou vyšší než v krvi, kde je androstendion rychle konvertován na epitestosteron erytrocyty (M ö s t l aj., 1980). Vrchol hladin androstendionu se objevuje v 16 týdnech (A m a n n a W a l k e r , 1983), souhlasně s procentickým vrcholem (17 %) obsahu Leydigových buněk ve varleti (W r o b e l , 1990) a potom klesá. Od 30 týdnů věku je dominantním androgenem ve varleti býka testosteron (R a w l i n g s aj., 1978; S e c c h i a r i aj., 1976).

Průměrné hladiny testosteronu v séru býků v průběhu prepubertálního období kontinuálně stoupají. Testosteron je produkován v epizodických sekrečních cyklech. Koncentrace testosteronu v séru kolísá v rozmezí hladin blízkých nule až po 2,5 ng/ml ve čtvrtém měsíci, 5 ng/ml v pátém měsíci a 7 ng/ml v osmém měsíci věku (M ö s t l aj., 1984). Charakter produkce testosteronu jako odpovědi na stimulaci exogenně podaného GnRH se mění z absence odpovědi ve čtyřech měsících věku (V ě ž n í k aj., 1990b) po postupně několikanásobně se zvyšující koncentraci testosteronu v příštích měsících (L a c r o i x a P e l l e t i e r, 1979). Obdobných výsledků dosáhli B a s s aj. (1977) po stimulaci produkce testosteronu pomocí hCG. Po stimulaci parenchymu varlat býků gonadotropiny *in vitro* odpověděly Leydigovy buňky všech věkových skupin produkcí testosteronu (V ě ž n í k aj., 1990b). Schopnost produkce se s věkem zvyšovala.

Vzestup intratestikulární hladiny testosteronu od 18. týdne umožňuje následnou diferenciaci indiferentních podpůrných buněk v buňky Sertoliho a jejich rychlou proliferaci. 28. týden dosáhnou Sertoliho buňky 40násobného vzestupu oproti počtu ve 20 týdnech. Ve 20 týdnech se v semenotvorných kanálcích objevují první A-spermatogonie (C u r t i s a A m a n n, 1981).

Potenciálním inhibitorem gonadotropní sekrece u mladých býčků je estradiol (S c h a n b a c h e r aj., 1983). Aplikace estradiolových implantátů býkům v prepubertální fázi má za následek potlačení epizodické LH sekrece a z toho vyplývající supresi sekrece testosteronu a potlačení růstu varlat (S c h a n b a c h e r, 1981). Dochází ke zpoždění puberty, po odstranění implantátů se testikulární vývin obnoví. Estrogeny nepůsobí na úrovni varlete (D' O c c h i o aj., 1984), ale potlačují testikulární rozvoj blokováním gonadotropního výlevu na úrovni hypotalamu, inhibicí LHRH pulzačního generátoru (S c h a n b a c h e r, 1984). Pulzační aplikací LHRH lze tento efekt překlenout.

PUBERTA

Kontinuální a dlouhý proces endokrinních změn vrcholí nástupem puberty, což je stadium dosažení pohlavní zralosti. Její začátek je charakterizován jako doba, kdy samec poprvé vyprodukuje dostatečné množství spermií schopných oplodnit samici. Pro praktické účely byla tato doba definována pro býka, berana, hřebce a kance jako věk, kdy ejakulát obsahuje 50.10^6 spermií v 1 ml, ze kterých minimálně 10 % je pohyblivých (W o l f aj., 1965). Není ovšem synonymem pro sexuální zralost nebo dospělý stav, který přichází o měsíce nebo roky později (A m a n n a S c h a n b a c h e r, 1983). Vlivem zvýšené produkce androgenů dochází k rychlému vývoji pohlavních orgánů, růstu varlat a začínají se vyvíjet sekundární pohlavní znaky.

Charakteristika hormonálních vztahů v období puberty:

- dosažení puberty u býka v 8 - 10 měsících věku
- epizodická sekrece LH, testosteronu, estradiolu

– ustálení typu rovnováhy v ose hypotalamus - hypofýza - gonáda, která je udržována ustálenými zpětnovazebnými mechanismy
– stoupající produkce testosteronu v přirozených i exogenně navozených pulzech.

Věk, ve kterém dochází k nástupu puberty, se u jednotlivých plemen skotu liší. U holštýnského plemene býků nastupuje puberta v průměru ve 41 týdnech věku při dobrém krmení, při krmení *ad libitum* již ve 37 týdnech (A l m q u i s t , 1982). Obecně lze toto období zařadit do 8. až 10. měsíce věku, přičemž plné hodnoty spermiogramu dosahují býci až kolem 13. měsíce věku (V ě ž n í k aj., 1989). L u n s t r a aj. (1978) uvádí u švýcarského hnědého skotu dobu přibližně 38 týdnů, což bylo výrazně méně než u pěti masných plemen. Býci projevovali první sexuální zájem přibližně tři týdny před dosažením puberty a schopnosti oplození dosáhli přibližně šest týdnů po dosažení puberty.

Pulzační sekrece LH je nezbytná pro iniciaci růstu varlat a spermiogeneze (S c h a n b a c h e r aj., 1982). Epizodická sekrece testosteronu v průběhu denního cyklu byla u pubertálních a postpubertálních býků prokázána řadou autorů (K a r g aj., 1976; T h i b i e r , 1976a; S h a h aj., 1993).

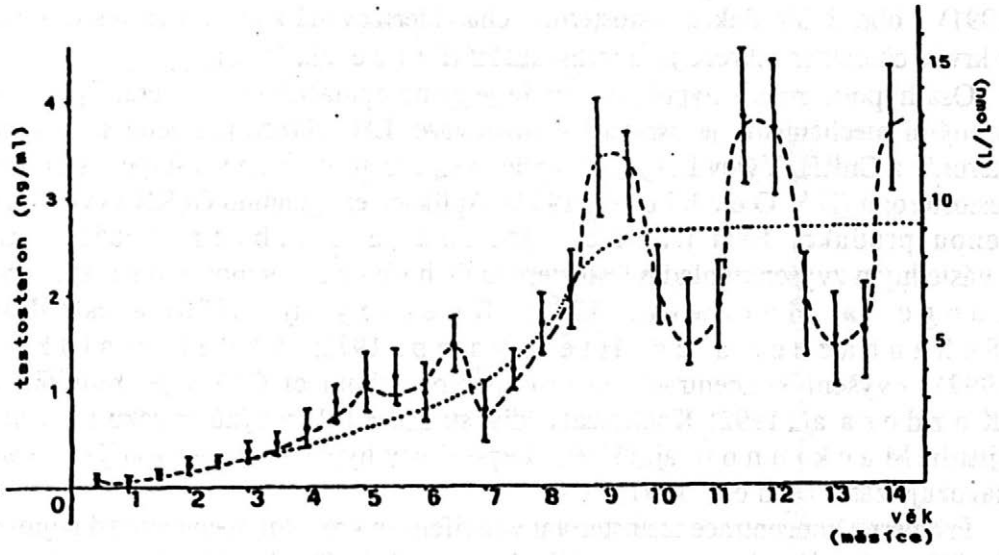
L u n s t r a aj. (1978) stanovili lineárně stoupající průměrnou koncentraci sérového LH a testosteronu od 7 do 13 měsíců věku býků. Býci plemen s vysokými průměrnými koncentracemi sérového testosteronu v tomto období dosáhli puberty dříve než skupiny s nízkými hladinami. Průměrná hladina sérového testosteronu ve věku 12 měsíců činila 5,8 ± 0,6 ng/ml, ve 13 měsících 7,3 ± 0,6 ng/ml.

K a r g aj. (1976) popisují dva vzestupy průměrných hladin sérového testosteronu. Po prvním vzestupu v 5. až 7. měsíci popisují po období vyrovnané produkce druhý vzestup po 10. až 13. měsíci věku býků a tedy po nástupu puberty, kdy průměrné hladiny sérového testosteronu kolísaly v rozmezí 1,9 až 11,9 ng/ml. Signifikantně vyšší hladiny testosteronu v séru u býků ve věku 7 až 13 měsíců oproti skupině prepubertálních prokázal K o z u m p l í k (1981). V pozorováních S c h a n b a c h e r a (1979a) průměrné hladiny sérového testosteronu začaly prudce stoupat od 7. měsíce (1 ng/ml), v 11. měsíci dosáhly maxima 10 ng/ml a ve 12. měsíci poklesly na 6 až 7 ng/ml.

Prokazatelně vyšší úroveň testosteronové odpovědi varlat na aplikaci hCG ve 14 měsících oproti sedmi měsícům prokázali B a s s aj. (1977) a S u n d b y a V e l l e (1983). Obdobných výsledků po aplikaci GnRH dosáhli u osmi a třináctiměsíčních býků V ě ž n í k aj. (1990a) a K o z d e r a (1991).

P ö s c h l (1989) zjistil při sledování dynamiky vývoje hladin některých hormonů býků u plazmatického testosteronu od 2 do 18 měsíců věku nárůst z 0,35 nmol/l v počátku sledování na 3,5 až 5,2 nmol/l se silným kolísáním během dne. Hladiny celkových volných estrogenů ve sledovaném období silně kolísaly a v období 9. až 12. měsíce věku vykázaly signifikantní pokles.

S e c c h i a r i aj. (1976) popisuje po prudkém vzestupu v předchozích měsících ustálenou, mírně stoupající průměrnou hladinu plazmatického testosteronu od 9. měsíce věku. Tato hladina vznikla jako průměr silně kolísajících testosteronových hladin (obr. 2).



2. Charakteristická křivka hladin testosteronu (čárkovaná čára) a nárůstu průměrných hladin testosteronu (tečkovaná čára) v závislosti na věku býka (S e c c h i a r i aj., 1976)

VĚK DOSPĚLOSTI

Období po dosažení nejen pohlavní, ale i sexuální a tělesné (chovatelské) zralosti je považováno za počátek věku dospělosti zvířete. V tomto období býk dosahuje takového stupně morfologického a funkčního vývoje, že je schopen zastávat pravidelnou reprodukční činnost, stává se producentem ejakulátu vyrovnané kvality, s ustálenou funkční odolností membrán spermií (V ě ž n í k aj., 1989). Ustálených a vyrovnaných hormonálních vztahů, týkajících se pohlavního systému, dosahuje býk kolem 13 měsíců věku.

Charakteristika dospělého jedince:

- rovnováha v ose hypotalamus - hypofýza - varle, udržovaná zpětnovazebnými mechanismy
- epizodická sekrece LH, testosteronu, estradiolu, pozvolná, mírně fluktuující sekrece FSH
- několikanásobné zvýšení hladin testosteronu jako odpověď na exogenní aplikaci GnRH.

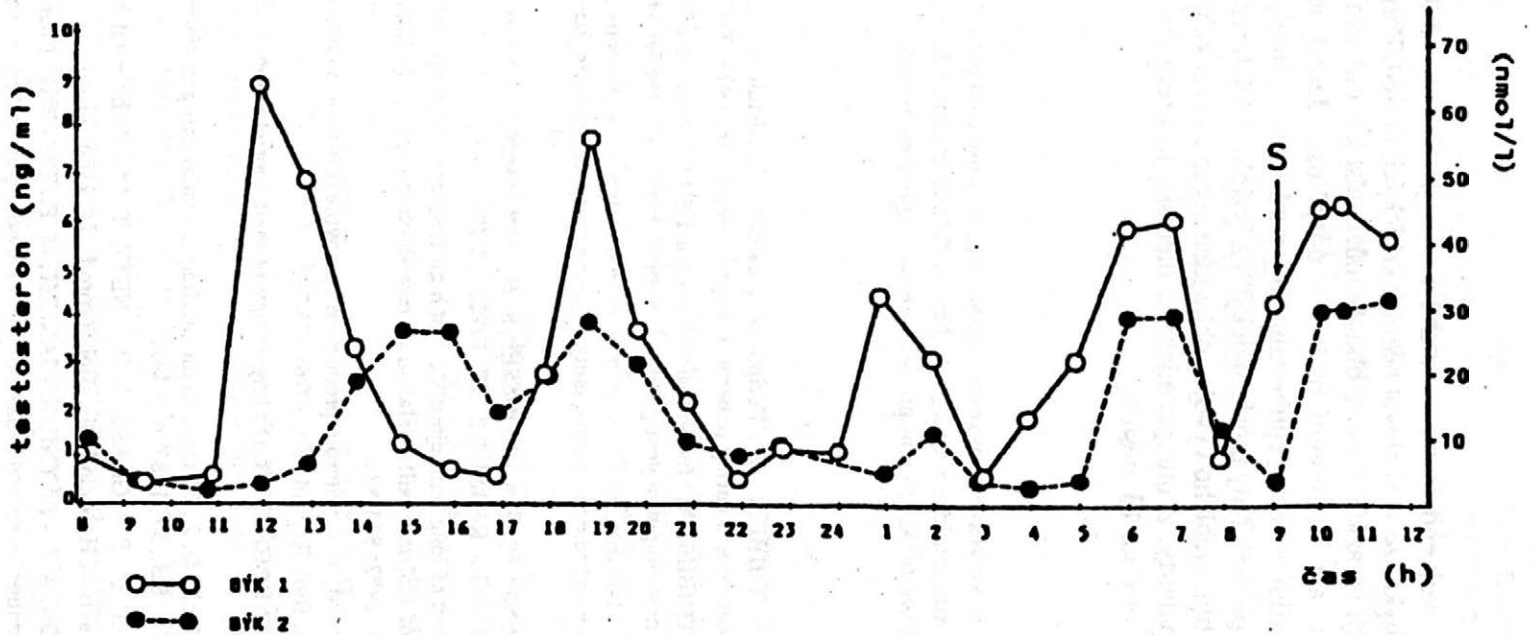
Zatímco přirozená epizodická sekrece LH (Welsh aj., 1979) je bezprostřední reakcí na GnRH stimulaci, výlev FSH je pomalý a pozvolný (Lincoln, 1979) i když v průběhu denního cyklu dochází k mírné fluktuaci hladiny FSH v krvi (Abdel Malak a Thibier, 1985b). Epizodická sekrece testosteronu je v průběhu 24 h charakterizována několika vrcholy, jejichž počet tři až sedm je individuální (Katongole aj., 1971; Johnson aj., 1982; Kozdera, 1991) - obr. 3. Produkce testosteronu charakterizovaná koncentrací testosteronu v krvi a charakter sekrece jsou individuální (Price aj., 1986).

Osa hypotalamus - hypofýza - varle je samoregulačním systémem. Zpětnovazebnými mechanismy je ustálená v rovnováze. LH sekrece je řízena sexuálními steroidy a GnRH. Výlev LH je u dospělého samce následován vzestupem sérového testosteronu (D' Occhio aj., 1982). Aplikace exogenního GnRH vyvolá zvýšenou produkci FSH (Abdel Malak a Thibier, 1985a) a LH s následným zvýšením hladin testosteronu (Thibier, 1976b; Post aj., 1987; Lange a Hartwig, 1992; Byerley aj., 1990) a estradiolu (Schanbacher a Ec Hternkamp, 1978; Abdel Malak aj., 1992). Zvýšení koncentrace testosteronu po stimulaci GnRH je individuální (Kozdera aj., 1992). Koeficient dědivosti 0,55 ± 0,15 u býků ve věku 18 měsíců zjistili Mackinnon aj. (1991). Depresi osy hypotalamus - hypofýza - varle navozuje zátěž (Knol, 1991).

Průměrná koncentrace testosteronu v periferním krevním oběhu stoupá nejméně do tří let věku býka (Amann a Walker, 1983). Tendenci hladin testosteronu zvyšovat se až do věku šesti až sedmi let pozorovali u býků Foote aj. (1976). Kozdera aj. (1993) pozorovali u býků ve věku 17 až 20 měsíců mírný pokles přirozených a GnRH stimulovaných hladin testosteronu v séru oproti skupině třináctiměsíčních býků. Pokles přirozených hladin testosteronu u postpubertálních býků pozorovali Secchiari aj. (1976), u kříženců skotu se zebu zjistili obdobný pokles v 16 až 17 měsících věku Wildeus aj. (1984).

Sezónní kolísání hladin testosteronu u býků neprokázali Secchiari aj. (1976) a Karg aj. (1976). Foote aj. (1976) zjistili u dospělých býků vyšší průměrnou hladinu testosteronu na jaře než na podzim. Podobně popsali sezónní fluktuaci hladin testosteronu i Sundby a Tollman (1978).

Obdobně jako LH, testosteron a glukokortikoidy patří estrogeny mezi hormony jejichž periferní koncentrace kolísá v epizodických cyklech (Juniewicz a Johnson, 1980). Estrogeny jsou syntetizovány a sekretovány varletem (Schanbacher a Echternkamp, 1978). Podle teorie „dvě buňky - dva gonadotropiny" je estradiol konvertován v Sertoliho buňkách z testosteronu pod vlivem FSH (Dorrington aj., 1978). Aplikace hCG (Amann a Ganjam, 1976) a GnRH (Schanbacher a Echternkamp, 1978; Abdel Malak aj., 1992) zvyšují koncentraci estrogenů jak v periferním oběhu, tak ve *v. spermatica*. Efekt suprese produkce gonadotropinů estrogeny je závislý na dávce estrogenů (Wolfe aj., 1992).



3. Kolísání hladin sérového testosteronu v průběhu dne s následnou odpovědí na aplikaci superanalogu GnRH (K o z d e r a , 1991) S - aplikace 50 μg Supergestranu

ZÁVĚR

V postnatálním vývoji endokrinních vztahů souvisejících s reprodukčním systémem a funkcemi u býka lze vysledovat několik kritických period. Porušení rovnováhy v hormonálních vztazích v tomto období může vést k narušení nejen vývoje pohlavního aparátu, ale i pohlavní funkce v dospělosti. Jedná se především o přechod fáze infantilní ve fázi prepubertální, kdy narůstání amplitudy a frekvence LH pulzů navozuje počátek řady morfologických a fyziologických změn ve varleti býka. Druhým obdobím rychlého vývoje pohlavních orgánů a prudkého růstu varlat je období nástupu puberty. Z ontogenetického hlediska je vzestupný hormonální vývoj býka završen ve věku 13 měsíců.

Poznámka

Vzhledem k tomu, že ve veškeré citované zahraniční literatuře jsou používány ke stanovení koncentrace testosteronu jednotky ng/ml, jsou ve článku citované hodnoty vyjádřeny v těchto jednotkách. Převodní koeficient pro testosteron z ng/ml na nmol/l je 3,467.

Literatura

ABDEL MALAK, G. - THIBIER, M.: Peripheral plasma androstendione and testosterone concentrations in bulls before and during puberty. J. Reprod. Fertil., *56*, 1979: 7-10.

ABDEL MALAK, G. - THIBIER, M.: Individual variations in FSH release after a GnRH challenge and relationship with semen output in young bulls. J. Reprod. Fertil., *75*, 1985a: 345-350.

ABDEL MALAK, G. - THIBIER, M.: Lack of relationship between spontaneous fluctuations of FSH, LH and testosterone and semen output quality in young postpubertal bulls. Zuchthygiene, *20*, 1985b: 222-228.

ABDEL MALAK, G. - ESSAWI, S. A. - YOUSSEF, R. H. - SOLIMAN, F. A.: Testicular response to GnRH in buffalo bull. Anim. Reprod. Sci., *27*, 1992: 123-128.

ALMQUIST, J. O.: Effect of long term ejaculation at high frequency on output of sperm, sexual behavior, and fertility of Holstein bulls; relation of reproductive capacity to high nutrient allowance. J. Dairy Sci., *65*, 1982: 814-823.

AMANN, R. P. - GANJAM, V. K.: Steroid production by bovine testis and steroid transfer across the pampiniform plexus. Biol. Reprod., *15*, 1976: 695-703.

AMANN, R. P. - SCHANBACHER, B. D.: Physiology of male reproduction. J. Anim. Sci., *57*, Suppl. 2, 1983: 380-403.

AMANN, R. P. - WALKER, O. J.: Changes in the pituitary-gonadal axis associated with puberty in Holstein bulls. J. Anim. Sci., *57*, 1983: 433-442.

AMANN, R. P. - WISE, M. E. - GLASS, J. D. - NETT, T. M.: Prebubertal changes in the hypothalamic-pituitary axis of Holstein bulls. Biol. Reprod., *34*, 1986: 71-80.

BASS, J. J. - PETERSON, A. J. - PAYNE, E. - JARNET, M. P.: The effect of neonatal estrogen treatment on plasma hormone levels and behavior in pre- and post- pubertal bulls. Theriogenology, *8*, 1977: 59-70.

BLANC, M. R. - HOCHEREAU-DE REVIERS, M. T. - CAHOREAU, C. - COUROT, M. - DACHEUX, J. C.: Inhibin: effects on gonadotropin secretion and testis function in ram and rat. In: FRANCHIMONT, P. - CHANNING, C. P. (eds.): Intragonadal Regulation of Reproduction. New York, Academic Press, 1981. 229 s.

BYERLEY, D. J. - BERTRAND, J. K. - BERARDINELLI, J. G. - KISER, T. E.: Testosterone and luteinizing hormone response to GnRH in yearling bulls of different libido. Theriogenology, *34*, 1990: 1041-1049.

CHALLIS, J. R. G. - KIM, C. K. - NAFROLIN, F. - JUDD, H. L. - YEN, S. S. C. - BENIRACHKE, K.: The concentration of androgens, oestrogens, progesterone and LH in the serum of foetal calves throughout the course of gestation. J. Endocrinol., *60*, 1974: 107-115.

CHANTARAPRATEEP, P. - THIBIER, M.: LH and testosterone responses to gonadoliberin (LRH) treatment in young bulls prior to and during puberty. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., *19*, 1979: 637-646.

COUROT, M.: Action des hormones gonadotropes sur le testicule de l'agneau. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., *5*, 1965: 145-149.

CURTIS, S. K. - AMANN, R. P.: Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. J. Anim. Sci., *53*, 1981: 1645-1657.

DAVID, K. - DINGEMANSE, E. - FREUD, J. - LAQUER, E.: Über krystallinisches mannliches Hormon aus Hoden (Testosteron) wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. Z. Physiol. Chem., *233*, 1935: 281.

DEAVER, D. R. - GLASS, J. D. - GRIEGER, D. M. - REEVES, J. J.: Effects of estradiol on secretion of LH, hypothalamic function and testicular development in bull calves. Domest. Anim. Endocrin., *5*, 1988: 307-316.

D' OCCHIO, M. J. - GIFFORD, D. R. - HOSKINSON, R. M. - WEATHERLY, T. - FLAVEL, P. F. - MATTNER, P. E. - SETCHELL, B. P.: Reproductive hormone secretion and testicular growth in bull calves actively immunized against testosterone and oestradiol-17β. J. Reprod. Fertil., *79*, 1987: 315-324.

D' OCCHIO, M. J. - KINDER, J. E. - SCHANBACHER, B. D.: Patterns of LH secretion in castrated bulls (steers) during intravenous infusion of androgenic and estrogenic steroids: pituitary response to exogenous luteinizing hormone releasing hormone. Biol. Reprod., *26*, 1982: 249-257.

D' OCCHIO, M. J. - SCHANBACHER, B. D. - KINDER, J. E.: *In vitro* testosterone secretion by testicular tissue from young bulls and the effects of chronic and acute exposure to estradiol-17β. J. Anim. Sci., *58*, 1984: 949-954.

DORRINGTON, J. H. - FRITZ, I. B. - ARMSTRONG, D. T.: Control of testicular estrogen synthesis. Biol. Reprod., *18*, 1978: 55-64.

FALVO, R. E. - NALBANDOV, A. V.: Radioimmunoassay of peripheral plasma testosterone in males from eight species using specific antibody without chromatography. Endocrinology, *95*, 1974: 1466-1468.

FOOTE, R. H. - MUNKENBECK, N. - GREENE, W. A.: Testosterone and libido in Holstein bulls of various ages. J. Dairy Sci., *59*, 1976: 2011-2013.

GODFREY, R. W. - LUNSTRA, D. D. - SCHANBACHER, B. D.: Effect of implanting bull calves with testosterone propionate, dihydrotestosterone propionate or oestradiol-17β prepubertally on the pituitary-testicular axis and on postpubertal social and sexual behaviour. J. Reprod. Fertil., *94*, 1992: 57-69.

JOHNSON, B. H.: Effects of hemicastration on testicular functions in adult and young puberal bulls. Theriogenology, *10*, 1978: 257-268.

JOHNSON, B. H. - WELSH Jr., T. H. - JUNIEWICZ, P. E.: Supression of luteinizing hormone and testosterone secretion in bulls following adrenocorticotropin hormone treatment. Biol. Reprod., *26*, 1982: 305-310.

JUNIEWICZ, P. E. - JOHNSON, B. H.: Episodic fluctuation of total estrogens in peripheral blood of bulls: effects of estradiol-17β on LH and testosterone secretion. Biol. Reprod., *23*, 1980: 1029-1037.

KANEKO, H. - YOSHIDA, M. - HARA, Y. - TAYA, K. - ARAKI, K. - WATANABE, G. - SASAMOTO, S. - HASEGAWA, Y.: Involvement of inhibin in the regulation of FSH secretion in prepubertal bulls. J. Endocrin., *137*, 1993: 15-19.

KARG, H. - GIMENEZ, T. - HARTL, M. - HOFFMANN, B. - SCHALLENBERGER, E. - SCHAMS, D.: Testosterone, luteinizing hormone (LH), and follicle stimulating hormone (FSH) in peripheral plasma of bulls: levels from birth through puberty and short term variations. Zbl. Vet.-Med, R. A, *23*, 1976: 793-803.

KATONGOLE, C. B. - NAFTOLIN, F. - SHORT, R. V.: Relationship between blood levels of luteinizing hormone and testosterone in bulls, and the effects of sexual stimulation. J. Endocrin., *50*, 1971: 457-466.

KNOL, B. W.: Stress and the endocrine hypothalamus-pituitary-testis system: a review. The Veterinary Quarterly, *13*, 1991: 104-114.

KOZDERA, A.: Význam hladin testosteronu pro hodnocení plemenného býka. [Kandidátská disertace.] Brno 1991, 127 s. - Výzkumný ústav veterinárního lékařství.

KOZDERA, A. - VĚŽNÍK, Z. - RYŠAVÁ, L.: Average testosterone levels in bulls after GnRH stimulation at Breeder Bull Rearing Stations and A.I. Stations. Vet.Med. - Czech, *38*, 1993: 129-140.

KOZDERA, A. - VĚŽNÍK, Z. - RYŠAVÁ, L. - ŠIŠÁK, M. - ZAJÍC, J.: The evaluation of the endocrine function of testes in bulls. J. Physiol. Pharmacol., *43*, Suppl. 1, 1992: 234 (Abstr.).

KOZUMPLÍK, J.: The level of plasma testosterone during the prenatal and postnatal period of development in bulls. Acta Vet. (Brno), *50*, 1981: 27-32.

LACROIX, A. - PELLETIER, J.: LH and testosterone release in developing bulls following LH-RH treatment. Effect of gonadoectomy and chronic testosterone propionate pretreatment. Acta Endocrin., *91*, 1979: 719-729.

LANGE, A. - HARTWIG, W.: Endokrinologische Untersuchungen zur Sexualpotenz von Besamungsbullen. Wien. Tierarztl. Mschr., *79*, 1992: 112-114.

LINCOLN, G. A.: Differential control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone by luteinizing hormone releasing hormone in the ram. J. Endocrin., *80*, 1979: 133-140.

LINDNER, H. R.: Androgens in the bovine testis and spermatic vein blood. Nature (London), *183*, 1959, s. 1605.

LINDNER, H. R.: Androgens and related compounds in the spermatic vein blood of domestic animals. IV. Testicular androgens in the ram, boar and stallion. J. Endocrin., *23*, 1961, s. 171.

LUNSTRA, D. D. - FORD, J. J. - ECHTERNKAMP, S. E.: Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. J. Anim. Sci., *46*, 1978: 1054-1062.

MACKINNON, M. J. - CORBET, N. J. - MEYER, K. - BURROW, H. M. - BRYAN, R. P. - HETZEL, D. J. S.: Genetic parameters for testosterone response to GnRH stimulation and scrotal circumference in tropical beef bulls. Livestock Prod. Sci., *29*, 1991: 297-309.

McCARTHY, M. S. - CONVEY, E. M. - HAFS, H. D.: Serum hormonal changes and testicular response to LH during puberty in bulls. Biol. Reprod., *20*, 1979: 1221-1227.

McCARTHY, M. S. - SWANSON, L. V.: Serum LH concentration following castration, steroid hormone and gonadotropin releasing hormone treatment in the male bovine. J. Anim. Sci., *43*, 1976: 151-158.

McNEILLY, J. R. - McNEILLY, A. S. - WALTON, J. S. - CUNNINGHAM, F. J.: Development and application of a heterologous radioimmunoassay for ovine follicle-stimulating hormone. J. Endocrin., *70*, 1976: 69-79.

McNEILLY, A. S. - TSONIS, C. G. - BAIRD, D. T.: Inhibin. Human Reprod., *3*, 1988: 45-49.

MILLER, C. J. - AMANN, R. P.: Effects of pulsatile injection of GnRH into 6- to 14-wk-old bulls. J. Anim. Sci., *62*, 1986: 1332-1339.

MIYAMOTO, A. - UMEZU, M. - ISHII, S. - FURUSAWA, T. - ASAKI, J. - HASEGAWA, Y. - OHTA, M.: Serum inhibin, FSH, LH and testosterone levels and testicular inhibin content in beef bulls from birth to puberty. Anim. Reprod. Sci., *20*, 1989: 165-178.

MONGKONPUNYA, K. - HAFS, H. D. - CONVEY, E. M. - TUCKER, H. A. - OXENDER, W. D.: Serum luteinizing hormone testosterone and androstendione in pubertal and prepubertal bulls after gonadotropin releasing hormone. J. Anim. Sci., *40*, 1975: 682-686.

MÖSTL, E. - CHOI, H. S. - BAMBERG, E.: Rapid conversion of androstendione into epitestosterone in bovine blood *in vitro*. IRCS Medical Sci., *8*, 1980: 440-445.

MÖSTL, E. - CHOI, H. S. - BRUNAUER, P. - BAMBERG, E.: Androgengehalt im Blut von Stieren in der praepubertaren Phase. Wien. Tierarztl. Mschr., *71*, 1984: 90-94.

NETT, T. M. - ADAMS, T. E.: Further studies on radioimmunoassay of gonadotropin-releasing hormone: effect of radioiodination, antiserum and unextracted serum on levels of immunoreactivity in serum. Endocrinology, *101*, 1977: 1135-1144.

NISWENDER, G. D. - REICHERT, L. E. - MIDGLEY, A. R. - NAL-BANDOV, A. V.: Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. Endocrinology, *84*, 1969: 1166-1173.

PÖSCHL, M.: Dynamika koncentrace plazmatického prolaktinu (PRL), celkových volných estrogenů (E), testosteronu (T) a tyroxinu (T4) ve vývoji mladých býků. Československ. Fysiol., *38*, 1989, s. 359.

POST, T. B. - REICH, M. M. - BINDON, B. M.: Characterization of LH and testosterone responses to intramuscular injection of GnRH in tropical postpubertal bulls. Theriogenology, *27*, 1987: 305-315.

PRICE, E. O. - KATZ, L. S. - MOBERG, G. P. - WALLACH, S. J. R.: Inability to predict sexual and aggressive behaviors by plasma concentrations of testosterone and luteinizing hormone in Hereford bulls. J. Anim. Sci., *62*, 1986: 613-617.

RAWLINGS, N. C. - COOK, S. J.: Plasma concentrations of testosterone, androstendione, dihydrotestosterone, 5α androstane-3α, 17β-diol, 5α-androstane-3β, 17β-diol, and androsterone in bull calves: response to hCG. Can. J. Anim. Sci., *66*, 1986: 975-982.

RAWLINGS, N. C. - FLETCHER, P. W. - HENRICKS, D. M. - HILL, J. R.: Plasma luteinizing hormone (LH) and testosterone levels during sexual maturation in beef bulls calves. Biol. Reprod., *19*, 1978: 1108-1112.

SCHAMS, D. - GOMBE, S. - SCHALLENBERGER, E. - REINHARDT, V. - CLAUS, R.: Relationships between short-term variations of LH, FSH, prolactin and testosterone in peripheral plasma of prepubertal bulls. J. Reprod. Fertil., *54*, 1978: 145-148.

SCHANBACHER, B. D.: Relationship of in vitro gonadotropin binding to bovine testes and the onset of spermatogenesis. J. Anim. Sci., *48*, 1979a: 591-597.

SCHANBACHER, B. D.: Testosterone secretion in cryptorchid and intact bulls injected with gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone. Endocrinology, *104*, 1979b: 360-369.

SCHANBACHER, B. D.: Importance of the episodic nature of luteinizing hormone secretion for normal development of the bovine testis during puberty: interference with oestradiol-17β. J. Endocrin., *88*, 1981: 393-400.

SCHANBACHER, B. D.: Pituitary-testicular responses of estradiol-17β-implanted bull calves to continuous versus pulsatile infusion of luteinizing hormone-releasing hormone. J. Anim. Sci., *58*, 1984: 943-948.

SCHANBACHER, B. D. - D' OCCHIO, M. J. - GETTYS, T. W.: Pulsatile luteinizing hormone secretion in the castrate male bovine: effects of testosterone or estradiol replacement therapy. J. Anim. Sci., *56*, 1983: 132-138.

SCHANBACHER, B. D. - D' OCCHIO, M. J. - KINDER, J. E.: Initiation of spermatogenesis and testicular growth in oestradiol-17β-implated bull calves with pulsatile infusion of luteinizing hormone-releasing hormone. J. Endocrin., *93*, 1982: 183-192.

SCHANBACHER, B. D. - D' OCCHIO, M. J.: Validation of a direct radioimmunoassay for testosterone in unextracted serum from five species: application to study of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in males. J. Androl., *3*, 1982: 45-51.

SCHANBACHER, B. D. - ECHTERNKAMP, S. E.: Testicular steroid secretion in response to GnRH-mediated LH and FSH release in bulls. J. Anim. Sci., *47*, 1978: 514-520.

SCHANBACHER, B. D. - FLETCHER, P. W. - REICHERT, L. E.: Testicular compensatory hypertrophy in the hemicastrated calf: effects of exogenous estradiol. Biol. Reprod., *36*, 1987: 1142-1148.

SECCHIARI, P. - MARTORANA, F. - PELLEGRINI, S. - LUISI, M.: Variation of plasma testosterone in developing Friesian bulls. J. Anim. Sci., *42*, 1976: 405-409.

SHAH, R. G. - DESHPANDE, L. V. - NIGAM, R. - MEHTA, V. M. - PATEL, D. M. - KHARADI, V. B.: Episodic release of LH and testosterone in prepubertal, pubertal and postpubertal Surti Buffalo male calves. Indian J. Anim. Sci., *63*, 1993: 803-807.

SUNDBY, A. - TOLLMAN, R.: Plasma testosterone in bulls: seasonal variation. Acta Vet. Scand., *19*, 1978: 263-268.

SUNDBY, A. - VELLE, W.: Relationship between growth rate in bulls and human chorionic gonadotropin-induced plasma testosterone concentrations. J. Anim. Sci., *56*, 1983: 52-57.

THIBIER, M.: Dijurnal testosterone and 17- hydroxyprogesterone in peripheral plasma of young post-pubertal bulls. Acta endocrin., *81*, 1976a: 623-634.

THIBIER, M.: Effect of synthetic gonadotrophin-releasing hormone (Gn-RH) on circulating luteinizing hormone (LH) and testosterone in young post-pubertal bulls. Acta Endocrin., *81*, 1976b: 635-643.

VĚŽNÍK, Z. - KOZDERA, A. - ŠVECOVÁ, D. a kol.: Andrologické hodnocení plemenných býčků. [Závěrečná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1989, 39 s.

VĚŽNÍK, Z. - KOZDERA, A. - ŠVECOVÁ, D. - RYŠAVÁ, L. - DEMELA, J. - HOLČÁK, V.: Soubor vyšetření plemenných býčků na odchovnách k predikci jejich funkční úrovně na inseminačních stanicích. [Dílčí zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1990a. 34 s.
VĚŽNÍK, Z. - KOZDERA, A. - ŠVECOVÁ, D. a kol.: Responsibilita cílových tkání pohlavního systému v definovaném prostředí. [Závěrečná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1990b. 80 s.
WALTON, J. S. - EVINS, J. D. - WAITES, G. M. H.: Feedback control of follicle-stimulating hormone in pre- and postpubertal rams as revealed by hemicastration. J. Endocrin., *77*, 1978: 75-84.
WELSH, T. H. - RANDEL, R. D. - JOHNSON, B. H.: Temporal relationship among peripheral blood concentrations of corticosteroids, luteinizing hormone and testosterone in bulls. Theriogenology, *3*, 1979: 169-179.
WILDEUS, S. - ENTWISTLE, K. W. - HOLROYD, R. G.: Patterns of pubertal development in Sahiwal and Brahman cross bulls in tropical Australia. II.LH and testosterone concentrations before and after GnRH. Theriogenology, *22*, 1984: 375-384.
WISE, M. E. - RODRIGUEZ, R. E. - KELLY, C. M.: Gonadal regulation of LH secretion in prepubertal bull calves. Domest. Anim. Endocrin., *4*, 1987: 175-181.
WOLF, F. R. - ALMQUIST, J. O. - HALE, E. B.: Prepubertal behavior and pubertal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. J. Anim. Sci., *24*, 1965: 761-765.
WOLFE, M. W. - ROBERSON, M. S. - STUMPF, T. T. - KITTOK, R. J. - KINDER, J. E.: Circulating concentrations and pattern luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in circulation are changed by the circulating concentration of 17β-estradiol in the bovine male and female. J. Anim. Sci., *70*, 1992: 248-253.
WROBEL, K. H. - DOSTAL, S. - SCHIMMEL, M.: Postnatal development of the tubular lamina propria and the intertubular tissue in the bovine testis. Cell Tissue Res., *252*, 1988: 639-653.
WROBEL, K. H.: The postnatal development of the bovine Leydig cell population. Reprod. Domestic. Anim., *25*, 1990: 51-60.

Došlo 16. 2. 1994

Postnatal development of endocrine relations in the hypothalamus - hypophysis - testicle axis in bulls.

A review of basic knowledge of endocrine events associated with the development of bovine male reproductive organs during early postnatal ontogenesis and infantile, prepuberal, puberal and adult periods is presented. Changes in the dynamics of release of GnRH, LH, FSH, testosterone and other clinically significant androgens, oestrogens and inhibin, including their interactions in the hypothalamus - hypophysis - testicle axis are described. Attention is paid to the relationships between reproductive hormones and the most relevant morphological and physiological changes in bovine male reproductive organs during the postnatal development, particularly the multiplication of Leydig cells, the differentiation and multiplication of Sertolli cells, testicular growth and initiation of spermiogenesis.

Contact Address:

MVDr. Antonín K o z d e r a , CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství,
Hudcova 70, 621 32 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321241, fax 05 41211229

AD eko
A.S.

ADEKO a. s. Vám nabízí

- FINANČNÍ LEASING
- ZPROSTŘEDKOVATELSKOU OBCHODNÍ ČINNOST
- PORADENSTVÍ V OBLASTI PODNIKÁNÍ, FINANCOVÁNÍ A ORGANIZACE

ADEKO a. s.
Slezská 7
120 56 Praha 2

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

✦

OBSAH – CONTENTS

Šlosárková S.: Veterinary Research Institute..... 143

Šedivá I., Olejník P., Ryšánek D.: Minimal inhibition concentrations of selected antibiotics for strains of *Staphylococcus aureus* – Minimální inhibiční koncentrace vybraných antibiotik pro kmeny *Staphylococcus aureus* .. 159

Rychlík I., Bartoš M., Šesták K.: Use of DNA fingerprinting for accurate typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* – Využití DNA fingerprintingu pro přesnou typizaci *Actinobacillus pleuropneumoniae*..... 167

Herzig I., Hampl J., Dočekalová H., Písaříková B., Vlček J.: Vliv humátu sodného na ukládání kadmia v orgánech kuřat – The effect of sodium humate on cadmium deposition in the chicken organs 175

Růžičková V.: Growth and survival of *Salmonella enteritidis* in selected egg foods – Růst a přežívání *Salmonella enteritidis* ve vybraných vaječných potravinách..... 187

Urbanová E., Páčová Z.: Počítačové numerické identifikační systémy v diagnostice baktérií izolovaných z živočišných surovin – Computer numerical identification systems in diagnostics of bacteria isolated from animal raw materials 197

PŘEHLEDY

Kozdera A.: Postnatální vývoj hormonálních vztahů v ose hypotalamus - hypofýza - varle u býka – Postnatal development of endocrine relations in the hypothalamus - hypophysis - testicle axis in bulls..... 205

UPOZORNĚNÍ PRO ODBĚRATELE

Od letošního roku vyřizuje veškeré služby spojené s distribucí časopisu Veterinární medicína vydavatel - Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha.

Objednávky na předplatné posílejte na adresu:
Ústav zemědělských a potravinářských informací
referát odbytu
Slezská 7
120 56 Praha 2

Toto číslo obsahuje

PŘEHLED VÝZKUMNÝCH AKTIVIT A VYBRANÝCH PUBLIKACÍ

pracovníků Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně.

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 1994

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 7, 120 56 Praha