

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH  
INFORMACÍ

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

SLOVENSKÁ AKADÉMIA PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

1  
K 39 (LXVII)  
1994  
N 0375-8427

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

Doc. MVDr. Ivan H e r z i g , CSc., Veterinary Research Institute, 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

# RESEARCH INSTITUTE OF EXPERIMENTAL VETERINARY MEDICINE

(Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny)

*Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovak Republic*

Phone:	42-95-32011, facsimile: 42-95-31853
Director:	Doc. MVDr. Imrich M a r a č e k , DrSc.
Deputy Director:	Ing. Andrej H a v r i l a , M. Agr. Sc.
Secretary of Science:	MVDr. Pavol N a d' , CSc.
Secretary of International Contacts:	MVDr. Jan C h o m a , CSc.
Type of institution:	Government-funded research institute administered by the Ministry of Agriculture of the Slovak Republic

Number of employees: 120

Organizational chart:

9 Research Departments:

- Department of Bacteriology and Hybridoma Technology
- Department of Virology and Clinical Immunology
- Department of Gene Manipulations
- Department of Dietetics and Production Diseases
- Department of Gnotobiology and the Diseases of Youngs
- Department of Theriogenology and Health Genetics
- Department of Zoohygiene and Natural Veterinary Medicine
- Department of Environmental Hygiene
- Department of Food Hygiene

Experimental Centre

Department of Marketing Research

Economic and Staff Management

According to the Letter of Establishment, the Research Institute of Experimental Veterinary Medicine is the only veterinary research institution in the Slovak Republic, the mission of which is to ensure the development of veterinary sciences and research (mainly its applied branch). The RIEVM is involved in studies into the health and diseases of animals, the prevention of diseases and inducing active health in conventional and specialized herds on different types of farms (from cooperative farms to small private or even family farms) managed under

different soil and climatic conditions and in different production branches according to the regional traditions and customs. General research projects are carried out as well as special ones and superstructure consulting activities are offered. Both research and consulting assistance to guarantee the full nutritive value and hygienic inobjectability of raw materials and food of animal origin. The RIEVM has developed its activities within the following branches: (1) microbiology, epizootiology and immunology, (2) production, reproduction and hereditary health disturbances, (3) ecotoxicology, animal and food hygiene.

The research and consulting activities include:

- projects of non-investment character within veterinary ecological studies, elaborated for companies and larger territorial entities
- monitoring of heterogenous substances in the production environment of farm and free-living animals and in their organism as well as in feeds
- consulting activities including solution of topical veterinary health problems
- specific cytological and biochemical-genetic examinations for genotoxicity for the aims of health heredity control
- foundation of a database of animal wastes from the aspect of environmental hygiene
- database of the health, hygiene and veterinary-dietetic parameters of feeds for farm animals
- testing of resistance to disinfectants, disinsectants and deratization agents
- special consulting in final DDD activities mainly in the eradication of focuses of contagious and infectious diseases

Within the framework of special consulting, educational activities are of great importance. In co-operation with the Institute of Postgraduate Veterinary Studies, the Veterinary University and the Parasitological Institute of the Slovak Academy of Sciences the RIEVM takes part in the postgraduate training of veterinary surgeons. Education of ecologists of the District Veterinary Administrations has become very intense. The research workers of the RIEVM not only give lectures but also tutor postgraduate diplomas. Publishing of teaching aids and handbooks for postgraduate studies and development of an information database in the field of ecotoxicology are rather important. Since 1993 the RIEVM has been publishing the Slovak Veterinary Journal.

Co-operation with other Slovak institutions resulted in a certain degree of integration within the Scientific-Research Association of Veterinary Sciences in Košice. Successful international co-operation can be reported with the following institutions: Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis (Moscow), Moredun Research Institute (Edinburgh), Rowett Research Institute (Aberdeen), INRA (Clermont-Feraud-Theix, France), Research Institute of Feed Supplements and Veterinary Drugs (Jílové u Prahy, Czech Republic).

In 1988, co-operation in the development of biotechnologies in veterinary sciences was started with the University of Veterinary Medicine in Budapest and the Agricultural Biotechnology Center in Gödöllő.

## **IMPORTANT RESULTS OF RESEARCH IN 1993**

### **Optimized rapid tissue culturing test for in vitro titration of a rabies virus vaccination strain**

A rapid tissue culturing test for in vitro titration of a rabies virus vaccination strain and primoisolation of street strains was modified and optimized.

The effectiveness of both modifications of the RTGCIT tests was verified in comparative experiments using the in vitro intracerebral murine inoculation test (MIT).

The advantage of the tests is that they do not demand much time for analysis and reading of the results (24–48 h) after infection or preparation of the sample for examination. In vitro tests appear to be at least as sensitive or even more sensitive than MIT, they are much cheaper and more suitable from the ethical and ecological viewpoints.

### **Inactivated, concentrated and purified antirabic cell vaccine for farm animals**

A procedure of preparing a second generation antirabic vaccine was developed and the effectiveness of the vaccine verified. The parameters of the newly developed vaccine greatly comply with the international standards set for this type of biopreparations. The properties of the vaccine surpass those of foreign commercial preparations; the vaccine has a very good immunogenic activity and its areactogenicity follows from the utilization of a metabolizable lipoid adjuvans that has been developed in our laboratories.

The economic effectiveness of the vaccine consists in decreasing payments for imported vaccines by ensuring the production of a domestic vaccine, the properties of which surpass those of the former in the protection of both animals and man from rabies.

### **Antiserum against a type A staphylococcal enterotoxin**

At present, the antiserum against a type A staphylococcal enterotoxin (anti-SEA) can be used to protect the consumer since this is the most common type having the most serious effects. This antiserum is the starting component for the preparation of a set intended to determine A, B, C and D staphylococcal enterotoxins.

## **Nutritional additive stimulating the production and health in the young of ruminants**

A new preparation was developed to stimulate the digestive tract microflora in the young of ruminants; it positively affects production parameters and health. At in vitro testing of several variants that contained nutrients and growth factors of rumen bacteria, the optimum composition proved to contain 20% dried centrifuged milk, 20% glucose, 10% ascorbic acid, 40% soybean pepton and 10% yeast autolysate and had a stimulatory effect upon all metaboli groups of rumen bacteria observed.

Observation of the effects of the preparation upon selected indices of the immunoprotein profile in experimental calves revealed increased total protein, albumin and total immunoglobulin levels in the serum, however, the differences were not significant.

The mean daily weight gain of the experimental calves was by 8.72% higher than that of the control animals. The nutritive preparation positively influenced the functional development of the digestive tract and the macroorganism as a whole.

## **Use of monoclonal antibodies in increasing the quality and speed of detecting *Str. agalactiae***

B-streptococci (*Str. agalactiae*) can be identified using specific monoclonal antibodies (MA) developed by a hybridoma technique. An ELISA method has been developed that is suitable to detect a group-specific polysaccharide in immobilized *Str. agalactiae* cells on a solid phase. This method can serve as a final test which on the basis of an antigen categorizes "problematic" streptococci as belonging to group B.

## **Automated system of evaluating feed quality and quantity**

A computer-controlled automated evaluation system has been designed for the laboratory analyses of feeds; it employs optimized selection of digestibility coefficients in order to calculate the energetic value of the individual feed components. The program is linked to the subsequent automated elements of controlled nutrition.

The economic effectiveness of the project is ensured by the activities of the agrolaboratory and the increased precision of feed quality determination. Implementation of the system brings about an economic effect that becomes evident in savings of up to 0.9–6.8 Sk per dairy cow and day, depending on the hygienic level of the farm where the system is employed.

## **Controlled reproduction of farm animals**

Knowledge has been collected about the effects of repeated Follicotropin administration in the early puerperium of ewes upon thyroxin, triiodothyronin, oestradiol 17- $\beta$  and progesterone levels. Observing the interdependence of the given parameters in experimental animals a significant positive correlation was determined between T<sub>4</sub> and E<sub>2</sub> levels on day 14 after parturition. In the controls, significant results were only recorded in the correlation of T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> mainly during the second half of the observation period.

Investigation of changes in the cytological picture of vaginal smears and in the blood levels of ovarian hormones revealed a decrease of parabasal cell counts between days 1 and 7 after parturition with a subsequent increase up to day 14 and a maximum on day 42 p.p. A negative correlation between oestradiol levels and parabasal cell counts was observed on days 4 and 42 p.p., whereas a positive correlation between progesterone levels and basal and parabasal cell counts was observed on day 42 p.p.

Early pregnancy diagnosis has lead to remarkable results from day 26 of pregnancy on, when pregnant and non-pregnant sows could be differentiated. Under operational conditions the interval between day 36 and 50 of pregnancy proved to be the most suitable one for early pregnancy diagnosis. In view of the exactness of the examination this is the time when most pregnancies are detected.

## **Diagnostic kit for wheat protein determination in heat-processed meat products**

This kit is intended for use in the supervision of production (adherence to production standards) and enables to detect wheat meal in heat-processed meat products.

The most important issue with this examination is the protection of the consumer and the control of keeping to the prescriptions of cooked sausage production.

The kit is highly effective, causing a decrease of expenditures. The costs of one examination amount ot about 300 Sk with an imported kit but to less than 30 Sk with the domestic one.

## **Methods of environmental sanitation in the eradication of foci of epidemics in farm animals**

These methods are based on concrete technologies and procedures of focal epidemics sanitation, i.e. focal disinfection, disinsection and deratization. They include the most recent chemical preparations permitted in DDD activities in animal production on the territory of Slovakia.

### **Proposal for the Statute of the "Emergency veterinary sanitation groups"**

The proposal is based on a method of constituting emergency veterinary sanitation groups as an executive organ of the State Veterinary Administration that would be in charge of the sanitation of dangerous animal epidemic foci. The statute also defines the activities and the extent of the material and technical background of these groups.

### **A system of speeding up the innovation process in veterinary laboratory diagnostics**

A material has been elaborated that includes methodical issues as well as a survey of infectious diseases of animals in Slovakia. On the basis of these data the State Veterinary Administration of the Slovak Republic is cooperating in the formulation of agreements on collaboration with the reference laboratories and divisions of the State Veterinary Institute, e.g. in Zvolen, Nitra, Dolný Kubín, Prešov, etc.

*I. Maraček, P. Nad', G. Gréserová*

## ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ ZA ROK 1993 A I. POLROK 1994

BANYKÓ, J.: Polymorfizmus alfa<sub>s</sub> kazeínov u kozy bielej krátkosrstej bezrohej (Polymorphism of alpha<sub>s</sub>-caseins in the White Shorthaired Polled goat). *Vet. Med. – Czech*, 39, 1994, 5: 263–269.

BEKEOVÁ, E. – KRAJNICÁKOVÁ, M. – HENDRICHOVSKÝ, V. – MARAČEK, I.: Alkalická fosfatáza v puerpériu bahníc a jej vzťah k hormónom štítnej žľazy a ovariálnym steroidom (Alkaline phosphatase in the puerperium of ewes and its relation to thyroid hormones and ovarian steroids). *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993, 6: 359–368.

BEKEOVÁ, E. – KRAJNICÁKOVÁ, M. – HENDRICHOVSKÝ, V. – MARAČEK, I.: Alkalická fosfatáza a jej vzťah k tyroxínu, trijódtyronínu a 17 beta-estradiolu u bahníc ovplyvnených karbetocínom (Depotocín, inj., SPOFA) (Alcalic phosphatase and its relation to thyroxine, triiodothyronine, oestradiol 17-beta in carbetocin (Depotocin SPOFA) treated ewes). *Živoč. Výr.*, 38, 1993, 4: 307–316.

BÍREŠ, J. – BARTKO, P. – MARAČEK, I.: Chronická alopetická dermatóza kôz z aspektu plemenných a metabolických kritérií (Chronic alopetic dermatosis in goats with a view to the breeding and metabolic criteria). *Slovak Vet. J.*, XVIII, 1993, 1–2: 30–35.

BÍREŠ, J. – MICHNA, A. – BARTKO, P. – PISTL, J. – JUHÁSOVÁ, Z.: Suplementácia zinku, selénu a medi cestou čepco-bachorových peliet a jej vplyv na úroveň celulárnej a humorálnej odpovede u oviec (Zinc, selenium and copper supplementation through reticulum-rumen pellets and its effect on rate of cellular and humoral reactions in sheep). *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993, 10: 597–607.

BÍREŠOVÁ, M. – NAĎ, P. – BÍREŠ, J. – ROSIVAL, I.: Dynamika tvorby špecifických protilátok u oviec počas príjmu priemyselného substrátu z hlinikárne (The dynamics of specific antibody production in sheep fed an industrial substrate from an aluminium plant). *Vet. Med. – Czech*, 39, 1994, 2–3: 67–74.

BOMBA, A. – KRÁLIČEK, L. – KONIAROVÁ, I. – LEŠNÍK, F. – POŠIVÁK, J. – BUČKO, V. – ŽITŇAN, R.: Získavanie a odchov gnotobiotických jahniat a ich využitie vo veterinárnej medicíne (The recovery and rearing of gnotobiotic lambs and their use in veterinary medicine). *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993, 7: 403–411.

BOMBA, A. – KRÁLIČEK, L. – ŽITŇAN, R. – KRÁLIČEKOVÁ, E. – POLÁČEK, M.: Hodnotenie úrovne minerálneho metabolizmu teliat v období mliečnej výživy a odstavu na základe vybraných parametrov v krvi (Evaluation of mineral metabolism of calves in the period of milk diet and weaning on the basis of some parameters of the blood). *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993, 3: 141–150.

BOMBA, A. – LAUKOVÁ, A. – REIFFOTOVÁ, K.: Vplyv zloženia jadrovej krmnej zmesi na bachorový metabolizmus teliat (The effect of grain mixture composition on rumen metabolism in calves). *Živoč. Výr.*, 38, 1993, 11: 1003–1114.

BOMBA, A. – PAULÍK, Š. – KRÁLIČEK, L. – ŽITŇAN, R. – POLÁČEK, M.: Využitie vybraných parametrov v sére a krvi teliat pri posudzovaní úrovne dusíkového a energetického metabolizmu (The use of some serum and blood parameters for evaluation of the level of nitrogen and energy metabolism in calves). *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993, 3: 151–160.

BOMBA, A. – ŽITŇAN, R.: Vývoj a ovplyvňovanie tráviacich procesov mláďat prežúvavcov (Development and control of digestion in the young of ruminants). *Veterinářství*, 43, 1993, 1: 13–14.

BOMBA, A. – ŽITŇAN, R. – KONIAROVÁ, I. – STACHOVÁ, M. – KOLODZIEYSKI, L. – FEJEŠ, J. – LENÁRT, J.: Stimulácia bachorovej fermentácie cicajúcich jahniat (Stimulation of rumen fermentation in sucking lambs). *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993, 5: 275–285.

ELEČKO, J.: Aktuálnosť prevencie infekčného zápalu mliečnej žľazy oviec (Relevance of the prevention of infectious mastitis in sheep). *Chov Oviec, SZCHOK*, 15, 1993, 1–2: 17–18.

HAVRILA, A.: Modely a ich testovanie. Dopyt a ponuka po potravinárskych výrobkoch (Demand and supply of food commodities. Tests of models). *Zeměd. Ekon.*, 39, 1993, 8–9: 657–666.

HAVRILA, A.: Modelový prístup k dopytu po mlieku v Českej a Slovenskej republike (A model of milk demand: Czech and Slovak Republic). *Zeměd. Ekon.*, 39, 1993, 2: 127–144.

HAVRILA, A.: Faktory ovplyvňujúce spotrebu potravín v SR a ČR (A demand for food commodities in the Slovak and the Czech Republics). *Zeměd. Ekon.*, 40, 1994, 3–4: 327–336.

HAVRILA, A.: Efektívnosť nových vkladov do výroby a výskumu a ich vplyv na ponuku a dopyt po vlně (The effectiveness of new investments in the production and research sectors and their effect on wool supply and demand). *Zeměd. Ekon.*, 39, 1993, 5: 397–406.

HIPÍKOVÁ, V. – MOJŽIŠOVÁ, J. – BAJOVÁ, V. – TAKÁČOVÁ, D. – STROJNÝ, L.: Hodnotenie niektorých ukazovateľov bunečnej imunity po experimentálnej infekcii vírusom IBR u teliat ošetrovaných glukánom (Evaluation of some parameters of cellular immunity after experimental infection with IBR virus in glucane-treated calves). *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993, 7: 385–394.

HOLEČKOVÁ, B. – ŠUTIÁKOVÁ, I. – PIJÁKOVÁ, N. – DALLIOVÁ, K. – JENČÍK, M.: Aberácie chromozómov v periférnych lymfocytoch oviec z plemenného chovu (Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes in a group of breeding sheep). *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993, 9: 547–552.

CHOMA, J. – TATÁROVÁ, D. – HAJURKA, J.: Results of a long-term study of progesterone in superovulated cows. *Biopharm J. Vet. Pharm.*, 3, 1993, 5–6: 139–148.

JONECOVÁ, Z. – MAREKOVÁ, M. – KMEŤ, V.: Výskyt kmeňov streptokokov rezistentných na antibiotiká v bachorovom obsahu teliat (The occurrence of antibio-

tic-resistant strains of streptococci in the ingesta of calves). Vet. Med. – Czech, 38, 1993, 2: 75–82.

JONECOVÁ, Z. – NEMCOVÁ, R. – KMEŤ, V.: Vplyv podávania kvasiniek a laktobacilov na bachorovú fermentáciu u oviec. (The effects of feeding yeast and lactobacilli on the rumen fermentation in sheep). Živoč. Výr., 37, 1992: 771–776.

JURIŠ, P. – PLACHÝ, P. – DUBINSKÝ, P. – VENGLOVSKÝ, J. – TÓTH, F.: Vplyv aerobnej stabilizácie tekutých exkrementov ošpaných v laboratórnych podmienkach na vitalitu zárodkov *Salmonella typhimurium* a *Ascaris suum* (The effect of laboratory aerobic stabilization of liquid excrements of pig on vitality of *Salmonella typhimurium* and *Ascaris suum* germs). Vet. Med. – Czech, 38, 1993, 9: 553–558.

KOČIŠOVÁ, A. – PARA, L. – PETROVSKÝ, M.: Rezistencia muchy domácej na organofosfáty v okrese Košice. (The resistance of the house fly *Musca domestica* L. to organophosphates in the Košice district). Živoč. Výr., 39, 1994, 4: 357–364.

KONIAROVÁ, I.: Niektoré biochemické a fyziologické vlastnosti kmeňov *Propionibacterium acnes* izolovaných z bachora teliat a jahniat (Some biochemical and physiological characteristics of *Propionibacterium acnes* strains isolated from the rumen of calves and lambs). Vet. Med. – Czech, 38, 1993, 1: 43–52.

KONIAROVÁ, I. – ORSÁG, A. – LEDECKÝ, V.: Podiel anaeróbov na ochorení *dermatitis digitalis et interdigitalis* u hovädzieho dobytku (The role of anaerobes in the occurrence of *dermatitis digitalis et interdigitalis* in cattle). Vet. Med. – Czech, 38, 1993, 10: 589–596.

KORÉNEK, M. – ŠULÍK, E. – KORÉNEKOVÁ, B.: Endogénne a exogénne inhibítory enzýmov živých organizmov (Endogenous and exogenous inhibitors of enzymes in living organisms). Veterinářství, 43, 1993, 5: 180–182.

KORÉNEKOVÁ, B. – KOTTFFEROVÁ, J. – KORÉNEK, M.: Sledovanie obsahu dusičnanov a dusitanov v objemových krmivách. (Observations of nitrate and nitrite levels in voluminous feeds). Veterinářství, 43, 1993, 6: 221–222.

KRAJNICÁKOVÁ, M. – BEKEOVÁ, E. – HENDRICHOVSKÝ, V. – MARAČEK, I.: Koncentrácie celkových lipidov, cholesterolu a progesterónu v čase synchronizácie ruje a v priebehu gravidity oviec (Concentrations of total lipids, cholesterol and progesterone in the period of oestrus synchronization and during gravidity of sheep). Vet. Med. – Czech, 38, 1993, 6: 349–357.

KRAJNICÁKOVÁ, M. – BEKEOVÁ, E. – MARAČEK, I. – HENDRICHOVSKÝ, V.: Vplyv karbetocínu a gonadoliberínu na bunkový rozpočet pošvového steru bahníc v čase puerpéria (The effects of carbetocin and gonadoliberin on the cell count of vaginal smears in puerperal ewes). Živoč. Výr., 38, 1993, 6: 510–510.

KRAJNICÁKOVÁ, M. – BEKEOVÁ, E. – MARAČEK, I. – HENDRICHOVSKÝ, V.: Vybrané ukazovatele minerálneho profilu krvného séra oviec v jednotlivých fázach reprodukčného cyklu. (Selected mineral profile indices of the blood serum of sheep in the single phases of the reproductive cycle). Živoč. Výr., 38, 1993, 8: 717–724.

KRAJNÍČÁKOVÁ, M. – BEKEOVÁ, E. – MARAČEK, I. – HENDRICHOVSKÝ, V.: Dynamika niektorých minerálií v krvnom sére oviec a čase synchronizačného ošetrenia a v prvých dňoch gravidity (Dynamics of some minerals in the blood serum of sheep during synchronization and in the first days of pregnancy). Slovak Vet. J., XIX, 1994, 1: 22–24.

LAZÁR, L. – KOLODZIEYSKI, L: Steroidná dominancia, enzymatická aktivita, morfológický vzhľad buniek granulózy najväčších folikulov kráv (Steroid dominance, enzymatic activity and the morphological shape of granulosa cells). Vet. Med. – Czech, 38, 1993, 6: 321–332.

LEVKUTOVÁ, M. – BAJOVÁ, V. – HIPÍKOVÁ, V. – MOJŽIŠOVÁ, J. – HARVAN, M. – HUDÁK, P.: Vplyv nerozpustného fungálneho glukánu na niektoré ukazovatele imunity teliat (Influence of insoluble fungal glucan on several immunity items of calves). Vet. Med. – Czech, 38, 1993, 1: 31–42.

MARAČEK, I.: Využitelnosť biotechnických metód v riadení reprodukcie oviec v súčasných podmienkach hospodárskej transformácie. Veterinárství, 43, 1993: 62–65.

MARAČEK, I. – HENDRICHOVSKÝ, V. – KRAJNÍČÁKOVÁ, M. – LAZÁR, L.: Dominant follicle selection in sheep after Cloprostenol administration. Slovak Vet. J., XVIII, 1993, 1–2: 9–14.

MARAČEK, I. – SOLTÍ, L. – CHOMA, J. – BARNA-VETRÓ, I. – WÖLF-LING, A. – HENDRICHOVSKÝ, V.: Serum progesterone levels after biotechnical control of oestrus and ovulation in sheep (Sérové hladiny progesteronu po biotechnickom riadení estru a ovulácie u oviec). Poľnohospodárstvo, 40, 1994, 4: 283–293.

NEMCOVÁ, R.: Bakteriálna rezistencia a ťažké kovy v prostredí zvierat (Bacterial resistance and heavy metals in animal environment). Slovak Vet. J., XIX, 1994, 3: 133.

NEMCOVÁ, R. – ŠTYRIAK, I. – STACHOVÁ, M. – KMEŤ, V.: Isolation and partial characterization of three rumen *Lactobacillus plantarum* bacteriophages. (Izolácia a čiastočná charakteristika troch bakteriofágov *Lactobacillus plantarum* v bachore). Microbiologica, 16, 1993: 177–180.

NEMCOVÁ, R. – STACHOVÁ, M. – KMEŤOVÁ, M.: Adherence in *Bacteroides fragilis* strains (Adherencia u kmeňov *Bacteroides fragilis*). Biologie, 48, 1993: 57–59.

NEMCOVÁ, R. – MAREKOVÁ, M. – STACHOVÁ, M. – KMEŤ, V.: Plasmid-encoded properties in *Bacterioides fragilis* isolated from diarrhoeic pigs (Plazmidom kódované vlastnosti u *Bacterioides fragilis* izolovaného z hnačkujúcich ošípaných). Folia Microbiol., 38, 1993: 103.

ONDRAŠOVIČOVÁ, O. – ONDRAŠOVIČ, M. – PARA, L. – VARGOVÁ, M.: Zmeny niektorých chemických a mikrobiologických ukazovateľov v hnojovici počas skladovania a po pridaní chemických dezinfekčných prostriedkov (Changes of some chemical and microbiological parameters of slurry during storage and after addition of chemical disinfectants). Živoč. Výr., 39, 1994, 4: 365–374.

- OSTRÓ, A. – GONDOL, J.: Protilátky proti *Chlamydia trachomatis* v sére žien s hroziacim potratom a hroziacim predčasným pôrodom (*Chlamydia trachomatis* antibody in woman blood serum with suspected abortion and precocious delivery). *Gynekológ, II*, 1993, 6: 169–170.
- PIJÁKOVÁ, N. – ŠUTIÁKOVÁ, I.: C-heterochromatín u hospodárskych zvierat (C-heterochromatine in farm animals). *Veterinářství, 43*, 1993, 6: 223–224.
- SKALKÁ, J.: Použitie magneticky upravenej vody pri výkrme kurčiat (The use of magnetically processed water in chick fattening). *Veterinářství, 43*, 1993, 3: 112.
- SLANINA, L. – MARAČEK, I. – SOKOL, J. – HLINKA, D.: Princíp sebestačnosti v stratégii výživy (The principle of selfsufficiency in the strategy of nutrition). *Slovak Vet. J., XIX*, 1994, 3: 101–104.
- SLANINA, L. – NAGY, O. – ŠEDOVIČ, M. – KADERIAK, J.: Experimentálna paroxyzmálna hemoglobínúria teliat a jej dosah na hematologický a acidobazický profil (Experimental paroxysmal haemoglobinuria in calves and its effect on blood and acid-base indices). *Vet. Med. – Czech, 38*, 1993, 8: 459–466.
- ŠEDOVIČ, M. – NAGY, O. – SLANINA, L.: Experimentálna paroxyzmálna hemoglobínúria teliat a vybrané biochemické ukazovatele v krvi a moči (Experimental paroxysmal haemoglobinuria in calves and selected biochemical indices in the blood and urine). *Vet. Med. – Czech, 38*, 1993, 8: 467–475.
- ŠUTIÁKOVÁ, I. – DALLIOVÁ, K. – ŠUTIÁK, V. – PIJÁKOVÁ, N.: Izoenzýmy laktátdehydrogenázy u plemenných oviec a barančekov (Isoenzymes of lactate dehydrogenase in pure- and crossbred ewes and rams). *Vet. Med. – Czech, 38*, 1993, 10: 609–617.
- ŠUTIÁKOVÁ, I. – DALLIOVÁ, K. – HOLEČKOVÁ, B. – PIJÁKOVÁ, N. – ŠUTIÁK, V.: Štúdium laktát-dehydrogenázy krvnej plazmy dojníc v spádovej oblasti Východoslovenských železiarní (Observations of plasma lactate dehydrogenase activity in dairy cows kept in the proximity of the East Slovakian Iron Works). *Poľnohospodárstvo, 39*, 1993, 10: 830–839.
- VASIL, M. – ŠTEGENA, B.: K ekonomickej efektívnosti reprodukčného procesu (Economic effectiveness of reproduction process). *Vet. Med. – Czech, 38*, 1993, 1: 1–14.
- VASIL, M.: Kontrola infekčných mastítid v chove dojníc pri využití antimikrobiálnej terapie (Control of infectious mastitis on a dairy farm using antibiotic treatment). *Biopharm., 1–2, 3–4*, 1993: 41–50.
- VASIL, M.: Terapeutická účinnosť intramamárnych prípravkov Alpedrol (Léčivá), GAMARET (Léčivá), Oxaclen foam (Galena), Chronicin foam (Galena) a Oxymycoin foam (Galena) pri liečbe mastítid dojníc (Effectivity of the intramammary preparations Alpedrol, Gamaret, Oxaclen foam, Chronicin foam and Oxymycoin foam in the treatment of mastitis in dairy cows). *Biopharm., 1–2, 3–4*, 1993: 51–57.
- VASIL, M.: Redukcia hladiny premorenia mastítidami v stáde dojníc liečbou počas laktácie (How to decrease herd infestation with mastitis by treatment during lactation). *Biopharm., 5–6*, 1993: 125–130.

VASIL, M.: Využitie Oxaclenu foam a Syntarpenu 600 pri ovplyvňovaní hladiny premorenia infekčnými mastitídami v období zasušenia a dvoch týždňov po pôrode (The use of Oxaclen foam and Syntarpon 600 in affecting the rate of infestation with mastitis during the dry period and at two weeks after parturition). *Biopharm.*, 5-6, 1993: 131-135.

VILČEK, Š. – DELIOVÁ, I. – FORGÁČ, O. – STROJNÝ, L. – HARVAN, M. – BENKO, G.: Detekcia bovinného herpesvírusu-1 metódou dot-blot hybridizácie (Detection of bovine herpesvirus-1 by the dot-blot hybridization method). *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993, 4: 193-202.

VRTIAK, J. O. – MARAČEK, I.: Niektoré významné imunitné aspekty reprodukcie (Some important immune aspects of reproduction). *Poľnohospodárstvo*, 40, 1994, 3: 219-237.

ŽITŇAN, R. – BOMBA, A. – SOMMER, A. – KOŁODZIEYSKI, L.: Development of rumen metabolism and ruminal epithelium in lambs (Vývoj bachorového metabolizmu a bachorového epitelu u jahniat). *Arch. Anim. Nutr.*, 45, 1993: 227-233.

ŽITŇAN, R. – GALLO, J. – BOMBA, A. – GALLO, M. – SOMMER, A.: Úroveň bachorovej fermentácie výkrmového dobytku v období prechodu zo zimného kŕmenia na pašu a v ďalších cykloch pasenia (The level of rumen fermentation in beef cattle in the period of transition from winter feeding to grazing and in the subsequent cycles of grazing). *Živoč. Vyr.*, 38, 1993, 8: 705-714.

ŽITŇAN, R. – GALLO, J. – GALLO, M. – BOMBA, A. – SOMMER, A.: Vybrané biochemické ukazovatele dusíkového a energetického metabolizmu v plazme a krvi výkrmových býčkov v období prechodu na pašu (Some biochemical parameters of nitrogen and energy metabolism in the plasma and blood of beef bullocks in the grazing season). *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993, 9: 521-529.

ŽITŇAN, R. – BOMBA, A. – LAUKOVÁ, A. – SOMMER, A. – VENGLOVSKÝ, J. – BINDAS, L.: The effect of diet composition on the development of rumen digestion in lambs (Vplyv zloženia kŕmnej dávky na vývoj bachorového trávenia u jahniat). *Arch. Anim. Nutr.*, 45, 1993: 161-171.

## ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC ÚEVM, IX, 1993

BEKEOVÁ, E. – KRAJNICÁKOVÁ, M. – HENDRCHOVSKÝ, V. – MARAČEK, I.: Koncentrácia tyroxínu, trijódtyronínu, 17 beta-estradiolu a progesterónu u bahníc ošetrovaných dirigestranom (inj. SPOFA) v prvých dňoch po pôrode (Thyroxin, triiodothyronin, oestradiol 17-beta and progesterone concentrations in ewes after treatment with Dirigestran (inj. Spofa) in the first days after parturition). pp. 231-244.

BELIČKOVÁ, E. – GRIEGER, C.: Prehľad o priamych metódach diagnostiky stafylokokových enterotoxínov (A survey of direct diagnostic methods of staphylococcal enterotoxins). pp. 151-158.

BELIČKOVÁ, E. – PAŽÁKOVÁ, J.: Výskyt plesne *Geotrichum candidum* v bryndzi a v surovinách používaných na jej výrobu (Occurrence of the mould *Geotrichum candidum* in processed sheep's milk cheese and raw materials used for production of the latter). pp. 145–150.

BÍREŠ, J. – BARTKO, F. – JUHÁSOVÁ, Z. – KOVÁŘOVÁ, E. – JESENSKÁ, M. – WEISSOVÁ, T.: Distribúcia fluóru a hliníka v mäkkých tkanivách hospodárskych a voľne žijúcich zvierat z exponovanej oblasti hlinikárne (Distribution of fluorine and aluminium in the soft tissues of farm and free-living animals in the vicinity of an aluminium plant). pp. 181–190.

BÍREŠ, J. – KOVÁŘOVÁ, E. – JUHÁSOVÁ, Z. – WEISSOVÁ, T. – KOVALČÍKOVÁ, H.: Dynamika rizikových prvkov v krvom sére oviec v závislosti od plemenej príslušnosti a veku (Dynamics of risk elements in the blood serum of sheep and its dependence on breed and age). pp. 167–180.

ČERNÁ, S. – VALAŠEKOVÁ, N. – JURÁNIOVÁ, E. – PASTIERIKOVÁ, A. – BUDAY, L. – JURŠÍK, J. – FRANTOVÁ, H.: Plazmatická koncentrácia ketolátok ako indikátor stavu energetického metabolizmu dojníc (Plasma levels of ketone bodies as an indicator of energetic metabolism in dairy cows). pp. 121–138.

ELEČKO, J.: Analýza redukcie mastitíd dojníc v priemerných chovateľských podmienkach (Analysis of the reduction of mastitis in dairy cows under average breeding conditions). pp. 105–112.

FORGÁČ, O. – VILČEK, Š.: Syntéza a využitie derivátov biotínu na hybridizáciu nukleových kyselín (Synthesis of biotin derivatives and their use for nucleic acid hybridization). pp. 113–120.

HEINRICHOVÁ, K. – STACHOVÁ, M.: Izolácia a čiastočná charakterizácia pektinolytických enzýmov izolovaných z *Clostridium lochneadii* (Isolation of pectinolytic enzymes from *Clostridium lochneadii* and their partial characterization). pp. 87–98.

HOLEČKOVÁ, B. – PIJAKOVÁ, M. – DALLIOVÁ, K. – ŠUTIÁKOVÁ, I.: Sledovanie chromozómových aberácií u dojníc v spádovej oblasti hutníckeho kombinátu (Observations of chromosome aberrations in dairy cows in the vicinity of a metallurgical plant). pp. 99–104.

HURNÁ, E.: Využitie *in vitro* metód na zisťovanie cytotoxicity chemických látok (The use of *in vitro* methods in cytotoxicity assays of chemical substances). pp. 139–144.

JACKOVÁ, A. – PLEVA, J. – SIKLENKA, P.: Priebeh methemoglobinémie a transrenálny prestup dusitanov a dučnanov u teliat po perorálnej aplikácii vysokých dávok dusitanu a dusičnanu (The course of methaemoglobinaemia and transrenal passage of nitrites and nitrates in calves after peroral administration of increased nitrite and nitrate doses). pp. 199–206.

JONECOVÁ, Z. – STACHOVÁ, M. – KMEŤ, V.: Ovplyvňovanie bachorovej fermentácie *in vitro* suplementom na báze živých kvasiniek Yea-Sacc (Alltech) (*In vitro*

affection of ruminal fermentation with Yea-Sacc (Alltech), a supplement based on live yeasts). pp. 77–86.

KOČIŠOVÁ, A. – PETROVSKÝ, M.: Výskyt rezistentných kmeňov muchy domácej (*Musca domestica* L.) k vybraným druhom insekticídov v lokalite okresu Košice-vidiek (Prevalence of insecticide-resistant housefly (*Musca domestica* L.) strains in piglet houses of the district Košice-vidiek). pp. 159–166.

KOTTFEROVÁ, J. – KORÉNEKOVÁ, B.: Vplyv rizikových chemických prvkov na mliekárenskú kultúru *Streptococcus lactis* (Effects of risk elements on dairy cultures of *Streptococcus lactis*). pp. 47–54.

KRAJNÍČÁKOVÁ, M. – BEKEOVÁ, E. – MARAČEK, I. – HENDRICHOVSKÝ, V.: Dynamické zmeny niektorých hematologických parametrov v čase synchronizácie, inseminácie a gravidity oviec (Dynamic changes of some haematological indices during oestrus synchronization, insemination and pregnancy). pp. 245–256.

LAZÁR, L.: Rast a vývoj folikulov v rôznych štádiách pohlavného cyklu kráv (Growth and development of follicles in different stages of the sexual cycle in cows). pp. 67–76.

MAKÓOVÁ, Z. – ROSIVAL, I. – MIŠKO, J. – KOČIŠ, J.: Vplyv rôzneho príjmu N-látok na proteolytickú činnosť u bažantov (Effects of the intake of various levels of N-substances on proteolytic activity in pheasants). pp. 29–36.

MARAČEK, I. – HENDRICHOVSKÝ, V. – BODNÁR, V. – LAZÁR, L.: Najväčší zrejúci, neatretický terciárny folikul vaječníkov oviec v priebehu selekcie po podaní cloprostrenolu v luteálnej fáze pohlavného cyklu (The largest non-atretic tertiary follicle of sheep ovaries during selection after cloprostenol treatment in the luteal phase of the sexual cycle). pp. 55–66.

MARCIN, A. – SMUTNÝ, J. – BELIČKOVÁ, E. – SIKLENKA, P. – KMEŤ, V.: Elektroforetická diagnostika proteínov v bachorovej tekutine (Electrophoretic diagnosis of proteins in ruminal fluid). pp. 37–46.

NAGY, O. – SLANINA, L. – ŠEDOVIČ, M.: Štúdium acidobázy u teliat so zameraním na odber, riedenie krvi a druhovú telesnú teplotu (Studies into the acid-base balance in calves with special regard to blood sampling and dilution as well as body temperature of the species). pp. 7–20.

NAGY, O. – SLANINA, L. – ŠEDOVIČ, M. – ČEPA, M.: Acidobázický stav pri respiračnom syndróme teliat (Acid-base balance during the respiratory syndrome in calves). pp. 21–28.

NEMCOVÁ, R.: Príprava a regenerácia protoplastov u bachorových lactobacilov (Preparation and regeneration of protoplasts in ruminal lactobacilli). pp. 207–215.

SIKLENKA, P. – JACKOVÁ, A.: Zlúčeniny NO<sub>x</sub> z aspektu syntézy bielkovín v metabolizme hovädzieho dobytku (NO<sub>x</sub> compounds from the viewpoint of protein synthesis in the metabolism of cattle). pp. 191–198.

SKALKA, J.: Vplyv podávania magneticky upravenej vody na kvalitu mäsa nosníc a liahnivosť násadových vajec (Effects of the administration of magnetically proces-

sed water on meat quality in laying hens and on the hatchability of hatching eggs). pp. 223–230.

VASIL, M.: Skúsenosti s Chronycinom foam (Galena) pri redukcii hladiny premorenia mastitídami v stáde dojnic liečbou počas laktácie (Experience with the control of mastitis in dairy cows by Chronycin foam (Galena) treatment during lactation). pp. 215–222.

## ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC ÚEVM, X, 1994

BARAN, M. – MAKÓOVÁ, Z. – SKALICKÁ, M.: Mykologická a mykotoxikologická kontaminácia obilnín v našich podmienkach (Mycological and mycotoxicological contamination of grains in Slovakia). pp. 159–170.

BEKEOVÁ, E. – KRAJNÍČÁKOVÁ, M. – HENDRICHOVSKÝ, V. – MARAČEK, I.: Tyroxín, trijodtyronín, 17-beta-estradiol a progesteron po navodení ruje u bahníc počas sezónnej anestrie (Thyroxine, triiodothyronine, oestradiol 17-beta and progesterone after oestrus induction in ewes during seasonal anoestrus). pp. 135–148.

BELIČKOVÁ, E. – GRIEGER, C.: Termorezistencia baktérií *Staphylococcus aureus* z hľadiska tepelného ošetrovania mlieka (Heat resistance of *Staphylococcus aureus* bacteria from the viewpoint of heat processing of milk). pp. 187–194.

BOMBA, A. – BALÚN, J. – POLÁČEK, M.: Oplyvňovanie acidity slezu z aspektu prevencie a terapie tráviacich porúch (Abomasal acidity control from the viewpoint of the prevention and treatment of digestive disturbances). pp. 117–126.

HAVRILA, A.: Spotreba syrov v ČSFR a jej závislosť od ceny a príjmu obyvateľov (Cheese consumption in the ČSFR and its dependance on prices and on the inhabitant's income). pp. 195–208.

HURNÁ, E. – HOLEČKOVÁ, B. – ŠUTIÁKOVÁ, I.: *In vitro* metódy na zisťovanie cytotoxicity chloramfenikolu (*In vitro* methods for determining the cytotoxicity of chloramphenicol). pp. 111–116.

JACKOVÁ, A. – PLEVA, J. – SIKLENKA, P.: Vplyv dusičnanovej záťaže na reziduá v mäse a orgánoch (The effect of nitrate load on residues in meat and organs). pp. 67–76.

KORÉNEKOVÁ, B. – KOOTTFEROVÁ, J. – KORÉNEK, M.: Zisťovanie zmien titračnej kyslosti po prídavku dusitanov do mlieka s jogurtovou bakteriálnou kultúrou (Determination of titration acidity changes after the addition of nitrites to milk containing a yoghurt bacterial culture). pp. 215–226.

KOOTTFEROVÁ, J. – KORÉNEKOVÁ, B.: Zmeny kysacej aktivity mliekárenskej kultúry *Lactobacillus helveticus* účinkom rizikových prvkov (Risk elements cause changes in the acidifying activity of the *Lactobacillus helveticus* dairy culture). pp. 209–214.

KRAJNÍČÁKOVÁ, M. – BEKEOVÁ, E. – MARAČEK, I. – HENDRICHOVSKÝ, V.: Vplyv syntetického GnRH na cytologický obraz pošvového steru v puerperálnom

období bahníc (The effects of synthetic GnRH on the cytological picture of vaginal smears in the puerperium of ewes). pp. 27–40.

LAZÁR, L. – LENÁRD, J. – KORÉNEKOVÁ, B. – KOTTFFEROVÁ, J.: Prežívateľnosť a penetračná schopnosť býčích spermíí v cervikálnom hliene kráv v závislosti od kryštalizácie a koncentrácie ťažkých kovov (Survival and penetrating ability of bull sperms in the cervical mucus of cows in dependence on heavy metal crystallization and concentration). pp. 127–134.

MARAČEK, I. – HENDRICHOVSKÝ, V. – BEKEOVÁ, E. – KRAJNIČÁKOVÁ, M. – TATÁR, M.: Zmeny epitelov endometria oviec po podaní gonadoliberínu (Changes of the endometrial epithelium in ewes after gonadoliberin treatment). pp. 17–26.

MARCIN, A. – BELIČKOVÁ, E. – SIKLENKA, P.: Metóda imunologickej kvantifikácie pšeničnej múky v tepelne spracovaných mäsových výrobkoch (Immunological quantification of wheat flour in heat-processed meat products). pp. 149–157.

PAŽÁKOVÁ, J. – BELIČKOVÁ, E.: Vplyv koncentrácie vodíkových iónov na plesň *Geotrichum candidum* (The effects of hydrogen ion concentrations on the mould *Geotrichum candidum*). pp. 171–185.

PLACHÝ, P. – JURIŠ, P. – PLACHÁ, I.: Vplyv aeróbnej oxidácie primárnych kalov z čistiarní odpadových vôd na prežívanie vajíčok *Toxocara canis* a *Ascaris suum* v laboratórnych podmienkach (The effects of aerobic oxidation of primary sludges from wastewater treating plants on the survival of *Toxocara canis* and *Ascaris suum* eggs under laboratory conditions). pp. 49–58.

SIKLENKA, P. – BELIČKOVÁ, E. – JACKOVÁ, A. – KRAJNIČÁKOVÁ, M.: Odbúranie NO<sub>x</sub> látok v organizme bahníc v období puerpéria (Degradation of NO<sub>x</sub> substances from the organism of ewes in the puerperal period). pp. 41–48.

SKALKA, J.: Vplyv dlhodobej konzumácie magneticky upravenej vody na zdravotný stav a úžitkovosť dojníc (The effects of long-term consumption of magnetically processed water on the health and yield of dairy cows). pp. 59–66.

ŠUTIÁKOVÁ, I. – TIMKOVÁ, J.: Stanovenie mikrojadier v stimulovaných periférnych lymfocytoch hovädzieho dobytku s využitím cytochalasínu B (Determination of micronuclei in bovine stimulated peripheral lymphocytes using cytochalasin B). pp. 105–110.

TIMKOVÁ, J. – LEŠNÍK, F.: Amplifikácia plazmidu SP64 s inzertom provírusu BLV (SP64 plasmid amplification with a BLV provirus insert). pp. 97–104.

VASIL, M. – Van RIJ, H.: Možnosti ovplyvnenia hladiny premorenia mastitídami u dojníc v zasúšení intramammárnou liečbou (Possibilities of influencing the occurrence of mastitis in dry-standing dairy cows by intramammary treatment). pp. 89–96.

VENGLOVSKÝ, J. – JURIŠ, P. – PAČAJOVÁ, Z. – CHANDOGA, P. – VARGOVÁ, M. – PLACHÝ, P.: Vplyv rôznych spôsobov fermentácie hnojovice ošípaných za laboratórnych podmienok na prežívanie modelových patogénov (Different laboratory methods of porcine liquid manure fermentation and their effects on model pathogen survival). pp. 7–16.

## ZÁVEREČNÉ SPRÁVY ÚEVM, 1993

BARAN, M. a kol.: Mykologická kontaminácia kukurice aflatoxínom B<sub>1</sub> a návrh dekontaminácie (Mycological contamination of corn by aflatoxin B<sub>1</sub> and a proposal for decontamination). Grant 06.

BELIČKOVÁ, E. a kol.: Vypracovanie systému kontroly a zabezpečenia znižovania mikrobiologickej záťaže potravín (Elaboration of a system of controlling and decreasing the microbial load of foods).

BOMBA, A. a kol.: Vývoj nutričného prípravku na stimuláciu produkcie a zdravia mláďat prežúvavcov (Development of a nutritional preparation that would stimulate the production and health of ruminant young).

BOMBA, A. a kol.: Využitie gnotobiológie pre vypracovanie stimulačných metód nástupu a rozvoja bachorového typu trávenia mláďat prežúvavcov a získanie gnotobiontov pre experimentálne účely (The use of gnotobiology in elaborating methods for the stimulation of the onset and development of rumen digestion in ruminant young. Obtaining gnotobiontes for experimental purposes). Grant 01.

DELIOVÁ, I. a kol.: Infekčná boviná rinotracheitída – posúdenie stavu imuno-kompetencie, využitie molekulárno-genetických metód pre terénnu diagnostiku (Infectious bovine rhinotracheitis-assessing immune competence, the use of molecular-genetic methods in field diagnosis).

HENDRICHOVSKÝ, V. a kol.: Tvorba materiálo-technických predpokladov zaisťovania prevencie a terapie reprodukčných porúch prežúvavcov a ošpaných (Ensuring material and technical presuppositions for the prevention and treatment of reproductive disturbances in ruminants and swine).

LEŠNÍK, F. a kol.: Využitie antigénov pri EBL na jej prevenciu a diagnostiku (The use of antigens in EBL for prevention and diagnostics).

MARAČEK, I. a kol.: Veterinárna kontrola a biotechnológia riadenej reprodukcie v interakcii k výžive prežúvavcov. (Veterinary control and biotechnology of controlled reproduction in interaction with ruminant nutrition). Grant 02.

MARCIN, A. a kol.: Detekcia cudzích druhov rastlinných proteínov v potravinách živočíšneho pôvodu (Detection of foreign plant proteins in foods of animal origin).

NAĎ, P. a kol.: Návrh na zlepšenie monitoringu cudzorodých látok v poľnohospodárstve (A proposal for improving the monitoring of heterogenous substances in agriculture). Grant 03.

NAĎ, P. a kol.: Automatizované vyhodnocovanie nutričnej hodnoty a dietetickej nezávadnosti krmív podľa aktuálnych laboratórnych analýz a disponibilných krmných zdrojov (Automated evaluation of the nutritive value and dietetic unobjectability of feeds according to recent laboratory analyses and available resources).

ROSIVAL, I. a kol.: Vplyv výživy zvierat na obranyschopnosť voči chorobám a niektoré regulačné mechanizmy organizmu (The effects of nutrition upon resistance to diseases and some regulatory mechanisms of the organism). Grant 05.

SŮLIOVÁ, J. a kol.: Vypracovanie postupu prípravy purifikovanej, koncentrovanej antirabickej vakcíny s olejovým adjuvansom pre domáce zvieratá (The process of preparing a purified, concentrated antirabic vaccine with oil adjuvant for farm animals).

ŠUTIÁKOVÁ, I. a kol.: Prevencia chorôb zvierat a riadenie ich produkčného zdravia z genetického aspektu (The prevention of diseases and control of productive health in animals from genetic aspects).

VARGOVÁ, M. a kol.: Likvidácia použitého obalového materiálu liečív, rôznych biopřípravkov a ochranných pracovných pomôcok veterinárneho lekára a ním používaných chemikálií (How to dispose of wrapping material, medical products, biopreparations and working clothes of the veterinary surgeon and chemicals he uses).

VASIL, M. a kol.: Inovácia preventívnych a tlmiacich protimastitídnych metód pre rôzne ekosystémy prežúvavcov v nových podmienkach chovu najmä oviec a kôz (Innovation of preventive and suppressive antimastitic methods for different ruminant ecosystems under the new breeding conditions mainly of sheep and goats).

VENGLOVSKÝ, J. a kol.: Tvorba systému testácie a výberu prostriedkov na asanáciu pri výskyte nebezpečných nákaz a pri likvidácii ohniska nákazy (A system of testing and selecting means for sanitation at the occurrence of dangerous infections and at eradicating the infectious focus).

ZÁVADOVÁ, J. a kol.: Zdokonalenie laboratórnej diagnostiky besnoty a titrácie vírusu besnoty (Improvement of the laboratory diagnosis of rabies and titration of the rabies virus).

*P. Nad', G. Gréserová and A. Ružíková*

# **INTERNATIONAL SCIENTIFIC AND TECHNICAL CO-OPERATION IN 1993**

## **BILATERAL SCIENTIFIC AND TECHNICAL CO-OPERATION**

A bilateral understanding on scientific, research, technical and developmental co-operation between the Research Institute of Experimental Veterinary Medicine and the Institute for Animal Sciences of the Agricultural Biotechnology Center in Gödöllő has been signed for the years 1991–1996. Last year, co-operation in the implementation of biotechnical and biotechnological methods also continued with the Veterinary University of Budapest. Two posters were presented and one comprehensive lecture held at the IXth round-table conference on animal biotechnologies at the Pannonian Agricultural University in Mosonmagyaróvár. A manuscript entitled "Serum progesterone levels after biotechnological control of oestrus and ovulation in sheep" has been submitted and will be published in English in the journal "Poľnohospodárstvo" (Agriculture). At the scientific conference "Biotechnologies and biotechniques in agriculture and in the protection of environment" that was held in Košice between June 24 and 25, 1993, scientists of the collaborating organizations presented 5 lectures. On this occasion further contacts were established with scientific workplaces in Olsztyn and Krakow (Poland), as well as with Ukraine.

On the basis of a bilateral agreement two research projects (E02 and E03) were included in the collaboration with the WHO Research Centre at the Institute of Poliomyelitis and viral encephalitis of the Russian Medical Academy in Moscow. International co-operation in this field is also supposed to be established with the WHO Reference Centre for Rabies at the Institute Pasteur in Paris, the State Institute for Sera and Vaccines in Copenhagen and the WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research at the Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals in Tübingen, Germany.

Collaboration with the Moredun Research Institute in Edinburgh comprised the grant project "Effect of animal nutrition upon defense abilities against diseases and some regulatory mechanisms of the organism", contacts with the team of Drs. N. Suttle, D. Jones and L. Stevenson who have been studying the immune system and the interrelations between immunity and mineral and vitamin surplus or deficiency for a considerable time. The aims of the project, the suitability of the methods employed and the timing of experiments have been discussed and experience exchanged.

The Department of Gnotobiology and Diseases of the Young and the Rowett Research Institute in Aberdeen (Scotland) collaborate on a common project concerning gnotobiotic lambs. Upon invitation of Dr. R. J. Wallace, Dr. A. Bomba, CSc., visited the Rowett (September 16–October 10, 1993). During this

visit the results of an experiment focusing on the effects of the complexity of digestive tract microflora upon the level of digestive processes and the metabolic profile in lambs were evaluated. The lambs used in this experiment were inoculated by strains kindly provided by Dr. R. J. Wallace. The possibility of launching a project studying the interactions of intestinal microflora was discussed with Dr. C. S. Stewart. Another common project is being negotiated with the directors of both Institutes. Dr. A. Bombà, CSc., read a lecture on gnotobiotic lambs and sucklings, became acquainted with new laboratory methods and established working contacts with leading scientists of that Institute.

The Department of Animal Hygiene has established international co-operation with the following institutions:

- Institut für Tiermedizin und Tierhygiene mit Tierklinik of the Hohenheim University in Stuttgart (Prof. D. Strauch; the common problem concerns waste hygienization);
- Veterinary Faculty of the Ljubljana University (Prof. M. Amon – collaboration in the field of zeolite utilization);
- Veterinary Faculty of the Zagreb University (Prof. Asaj – co-operation in the field of DDD);
- University of Chemical Technology in Prague, Institute of Solid Substance Chemistry (zeolite utilization).

Cooperation of the above department with these establishments has not yet been institutionalized.

#### PARTICIPATION IN INTERNATIONAL PROGRAMMES AND SCIENTIFIC AND TECHNICAL PROJECTS

Contact negotiations took place with several foreign workplaces. Formality the agreements have not yet been settled.

#### EVALUATION OF OFFICIAL JOURNEYS

The official journeys of the Institute's employees took place in agreement with the preceding activities, contacts and possibilities and within the aims of the Institute.

The countries visited:

Czech Republic (14 scientists, altogether 20 journeys);

Hungary (8 scientists, altogether 12 journeys);

Slovenia (1 scientist, 2 journeys);

The Netherlands (1 scientist, 1 journey);

Greece (1 scientist, 1 journey);

England (1 scientist, 1 journey).

In addition, a long-term study-stay for one scientist in England was funded by the host institution.

#### Aims of the journeys:

In most cases the trips were aimed at presenting own results either through the lectures or posters. Twelve trips did not include an active presentation in the public: they were aimed at getting acquainted with modern laboratory methods what is essential for the development of the scientific and research activities of our Institute. These methods included: innovated preparation and digestion of samples for atomic absorption spectrophotometry, methods for in vitro testing of the harmfulness of chemical substances, methods in immunochemistry, cell immunology, molecular biology and immune histochemistry. Within a project examining the genetic polymorphism of milk proteins in our breeds of sheep and goats consultations and laboratory work were carried out that focused on the isolation and identification of alpha S1 casein alleles by the PCR technique. Information has been compiled on alternative methods of producing veterinary biopreparations used in the prevention of animal health.

Altogether 16 contributions were presented at international meetings, 7 of them in the Czech Republic, 6 in Hungary and one in Slovenia, Greece and England, respectively. The environment was actually dealt with in 8, i.e. 50% of the contributions; reproduction, manipulation of rumen microflora, gnotobiology and immunology were the topics presented in 4, 2, 1 and 1 lecture/poster, respectively.

#### The benefits of the journeys:

- Presentation of results and the level and stage of definition of a given problem in the Slovak Republic.
- Accumulation of knowledge about the level of investigations, about new prospective trends and their implementation into practice. Acquisition of new stimuli for the subsequent activities of each scientist.
- Innovation of methods or implementation of new methods into the activities of the different laboratories. The methods concerned are as follows:
  - PCR technique with wide possibilities of utilization in determining bacteria or viruses, in genetic studies, embryo manipulations, etc.;
  - ELISA technique for the determination of cancerogenic T2 toxins in feeds;
  - implementation of alternative methods for cytotoxicity assays of chemical substances;
- Acquisition of Anr-4 and Nea-2a cell cultures for the laboratories of our Institute.

Reports on official journeys containing information and proposals were submitted by Drs. I. Maraček, A. Bomba and A. Marcin

*J. Choma and G. Gréserová*

**Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 12/1994 časopisu**

**VETERINÁRNÍ MEDICÍNA**

**mají být uveřejněny tyto příspěvky:**

**Lukášová J.:** Mechanismus působení močoviny v mléce na kysací aktivitu mléčných kultur

**Laciaková A., Laciak V.:** Možnosti eliminácie mikroskopických vláknitých húb dezinfekčnými prostriedkami

**Pavlásek I.:** Lokalizace endogenních vývojových stadií *Cryptosporidium meleagridis* Slavin, 1955 (*Apicomplexa: Cryptosporidiae*) u ptáků

**Nezval J., Literák I.:** *Toxoplasma gondii* in muskrat (*Ondatra zibethicus*)

**Medveďová M., Pajerský A., Tomašovičová O.:** Zmeny pľúc myší vyvolané migráciou lariev *Toxocara canis*

# GROWTH AND DEVELOPMENT OF FOLLICLES IN DIFFERENT PHASES OF THE OESTROUS CYCLE IN COWS IN RELATION TO THE PRESENCE OF THE CORPUS LUTEUM AND AN OESTROGEN-DOMINANT FOLLICLE

L. Lazár, I. Maraček

*Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice*

In this work recruitment and growth of follicles and quality of the largest ones were determined and compared in the individual stages of the bovine oestrous cycle (stages I, II, III and IV – days 1–4, 5–10, 11–17 and 18–21, respectively) in relation to the presence of the corpus luteum and an oestrogen-dominant follicle on the ovary. The maximum proportions of small (< 4.9 mm), medium-sized (5.0–9.9 mm) and large (> 10 mm) follicles were observed in stages IV (93.4%), I (16.6%) and III (4.8%), respectively. The results of our study revealed the presence of the large oestrogen-dominant follicle that have negative effects upon the presence of another large follicle on the ovary and upon the recruitment of small (< 4.9 mm) follicles. On the contrary, the presence of a large oestrogen-dominant follicle positively influenced the occurrence of 5–9.9 mm follicles in all stages of the cycle. No effects of the CL were observed upon the presence of medium-sized and large follicles. Although the differences were insignificant, negative effects of the CL were observed in relation to the occurrence of small (< 4.9 mm) follicles.

cows; oestrous cycle; follicles; corpus luteum; oestrogen-dominant follicles

The control mechanisms of follicular growth and development have not yet been sufficiently explained. In the course of the sexual cycle permanent growth and atresia of follicles are seen. Opinions on the presence and number of follicular growth waves differ. According to R a j a k o s k i (1960) two follicular growth waves occurred in cows, one between days 1 and 12 of the cycle and the other between day 13 and ovulation. On the contrary, M a t t o n et al. (1981) who used Indian blue staining to monitor follicular development reported three growth waves, namely, one between days 3 and 7, the other one between days 7 and 13 and the third one beginning 3–4 days before ovulation. I r e l a n d and R o c h e (1983) claim the 3rd wave to occur 4 days before ovulation. By means of ultrasonographic devices it could be proved that cows with two or even three growth waves were not uncommon. Most cows with a shorter cycle have two follicular growth waves, whereas those with a prolonged cycle develop three

waves (K n o p f et al., 1989). In each phase of the sexual cycle large oestrogen-dominant follicles can be observed on one of the ovaries (L a z á r et al., 1990, 1991); these follicles are considered dominant, whereas the progesterone-dominant ones are considered to be follicles in regression. Under the simultaneous influence of LH and FSH (K o l e n a and C h a n n i n g , 1972) cyclic adenosine monophosphate as the second messenger participates in the control of steroidogenesis (R o b i n s o n , 1970). This statement is based on the acute increase in cAMP production by follicular granulosa cells after gonadotropic stimulation (K o l e n a and C h a n n i n g , 1972).

This work focused on determining and comparing the recruitment and growth rate of follicles and the quality of the largest ones in different stages of the oestrous cycle in cows, in relation to the presence of the corpus luteum and an oestrogen-dominant follicle on the ovary.

## MATERIALS AND METHODS

Ovaries of healthy non-pregnant cows were obtained at the abattoir by random excision of the sexual organs within 30 min. of slaughter and transported in ice-chilled saline. The experiment included 31 pairs of ovaries; the 47 largest follicles were subjected to follicular fluid aspiration. After centrifugation at 3000 g the supernatant was stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  until processing.

In order to determine oestradiol 17-beta and progesterone levels in the follicular fluid the RIA-test-Estra (SI-125-9) and RIA-test-Prog (SI-125-6) commercial kits manufactured by URVJT Košice were used, respectively. The fluid was diluted with 1.5% bovine gamma-globulin. The intra- and inter-assay coefficient of variation presented 10.1 and 13.3%, respectively, for the oestradiol kit and 11.4 and 13.7%, respectively, for the progesterone kit.

The stage of the oestrous cycle was determined on the basis of the presence and morphological character of the CL: stage I (day 1-4), stage II (day 5-10), stage III (day 11-17), stage IV (day 18-20). Accuracy of stage prediction was confirmed by serum progesterone level measurements. Steroid dominance of the follicles was ascertained by the method of C a l l e s e n et al. (1986), using an index based on the ratio of progesterone and oestradiol 17 beta-concentrations. Follicles with an index below 0.8 were considered oestrogen-dominant. An index of 0.8-1.2 was ascribed to follicles in the transitive phase of development, whereas an index above 1.2 was related to progesterone-dominant follicles.

After the size of follicles had been determined via calliper rule, the follicles were divided into three categories: small (less than 4.9 mm), medium (5-9.9 mm) and large (more than 10 mm). The numbers of different-sized follicles were observed in relation to the presence of both the CL and the oestrogen-dominant follicle on the ovary; the percentage of the individual size categories in different

stages of the cycle and the steroid dominance of other large follicles were also stated.

After determining the significance of differences between the standard deviations by the *F*-test (S o k a l and R o h l f , 1969) the significance of differences between two stages was calculated by the unpaired Student's *t*-test. The results are given as  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ .

## RESULTS

Comparing the occurrence of the different-sized follicles, the highest mean numbers of the large and small ones were observed in the follicular phase of the cycle, i.e., in stage IV. The greatest proportion of small (< 4.9 mm) follicles was seen in stage IV when they made out 93.4% of all follicles present on the ovaries; this was significantly more than in stage II (88.5%,  $P < 0.01$ ), stage III (84.8%,  $P < 0.01$ ) and stage I (78.7%,  $P < 0.05$ ). The proportion of medium sized follicles (5–9.9 mm) presented 16.6, 10.4, 7.6 and 3.5% in stages I, III, II and IV, respectively. The highest proportion of large follicles (> 10 mm) was observed in stage III (4.8%), followed by stages I, II and IV in which 4.7, 3.9 and 3.1% of large follicles were recorded (Tab. I).

The presence of a CL was shown to have a negative influence on the recruitment of up to 4.9-mm follicles in all stages of the sexual cycle. The 5–9.9-mm follicles in stage II and > 10-mm follicles in stage III of the cycle were similarly affected. In stage IV of the cycle more follicles of the two above-mentioned size categories were observed on the ipsilateral than on the contralateral ovary (Tab. II) but the differences were not significant.

In stage I of the cycle oestradiol 17-beta and progesterone levels were determined in 3 of 6 large follicles: 2 were shown to be oestrogen dominant and one was progesterone-dominant. In stage II hormone concentrations were stated in 10

### I. Total number of follicles and proportion of the individual size categories

Oestrous cycle	Number of animals	<i>F</i>	Proportion of size categories (Nr. and %)					
			> 10 mm	%	5–9.9 mm	%	< 4.9 mm	%
Stage I	4	127	6	4.7	21	16.6	100 <sup>d</sup>	78.7
Stage II	10	383	15	3.9	29	7.6	339 <sup>c</sup>	88.5
Stage III	8	290	14	4.8	30	10.4	246 <sup>b</sup>	84.8
Stage IV	8	488	15	3.1	17	3.5	456 <sup>a</sup>	93.4

a, b; a, c;  $P < 0.01$ ; a, d;  $P < 0.05$

*F* – total number of follicles

## II. Effects of the CL present on the mean number of follicles in the single stages of the oestrous cycle

Oestrous cycle	Nr. of ovaries	Mean number of follicles ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )			
		> 10 mm	5-9.9 mm	< 4.9 mm	
Stage I	CL <sup>+</sup>	4	0.75 ± 0.25	2.75 ± 0.62	11.5 ± 6.23
	CL <sup>-</sup>	4	0.75 ± 0.48	2.5 ± 0.96	13.5 ± 7.90
Stage II	CL <sup>+</sup>	10	0.7 ± 0.21	1.0 ± 0.33	15.9 ± 2.63
	CL <sup>-</sup>	10	0.8 ± 0.13	1.8 ± 0.39	18.0 ± 2.46
Stage III	CL <sup>+</sup>	8	0.5 ± 0.19	1.6 ± 0.68	14.9 ± 2.64
	CL <sup>-</sup>	8	1.3 ± 0.25	2.1 ± 0.55	15.9 ± 3.05
Stage IV	CL <sup>+</sup>	8	1.1 ± 0.29	1.3 ± 0.36	27.0 ± 5.19
	CL <sup>-</sup>	8	0.75 ± 0.37	0.9 ± 0.48	30.0 ± 5.94

CL<sup>+</sup> - CL present on the ovary

CL<sup>-</sup> - CL absent

large follicles of which 5, 4 and 1 were progesterone-dominant, oestrogen-dominant and in the transitory stage of development, respectively. In stage III steroid levels were recorded in 9 follicles of which 5 were oestrogen-dominant and 4 progesterone-dominant. In stage IV 10 follicles were examined; of these 7 were oestrogen-dominant, 2 were progesterone-dominant and one was in the transitory stage of development. If a large oestrogen-dominant follicle was present, more large and medium-sized follicles were observed on the ipsilateral ovary than on the contralateral one; the latter harboured more small follicles. A similar picture could also be seen in the other stages of the cycle. Generally, a positive effect of the oestrogen-dominant follicle on the number of selected medium-sized follicles and a negative effect of the former on the number of recruited small follicles was observed, however, significance of differences could not be stated in any of the groups (Tab. III).

Throughout the observation period none of the pairs of ovaries revealed two large oestrogen-dominant follicles were not recorded on any of the pairs of ovaries. All other large follicles proved to be progesterone-dominant.

## DISCUSSION

Observation of the sexual cycle revealed the presence of a large follicle, either an oestrogen- or a progesterone-dominant one, in each of the stages. In some cases in the follicular stage even two large follicles could be seen of which one was oestrogen-dominant and growing, the other one progesterone-dominant and

III. Mean number of follicles on the ipsilateral and contralateral ovary in relation to the presence of the oestrogen-dominant follicle

Oestrous cycle	Ovary to ODF	Mean number of follicles $\pm$ SEM		
		> 10 mm	5-9.9 mm	< 4.9 mm
Stage I	I	0.5 $\pm$ 0.50	2.5 $\pm$ 0.50	20.5 $\pm$ 7.50
	C	absent	0.5 $\pm$ 0.50	17.5 $\pm$ 2.50
Stage II	I	absent	1.4 $\pm$ 0.39	19.8 $\pm$ 5.22
	C	0.6 $\pm$ 0.25	1.2 $\pm$ 0.49	20.4 $\pm$ 2.66
Stage III	I	0.3 $\pm$ 0.25	1.6 $\pm$ 0.50	18.2 $\pm$ 3.70
	C	0.3 $\pm$ 0.25	0.8 $\pm$ 0.25	19.0 $\pm$ 1.62
Stage IV	I	0.6 $\pm$ 0.29	1.6 $\pm$ 0.53	27.1 $\pm$ 4.91
	C	0.3 $\pm$ 0.19	0.7 $\pm$ 0.47	35.6 $\pm$ 5.66

ODF – oestrogen-dominant follicle; I – ipsilateral ovary; C – contralateral ovary

IV. The mean oestradiol 17-beta and progesterone levels in the oestrogen-dominant follicles

Stage I	2 319.0 $\pm$ 1 771.0 and 306.2 $\pm$ 176.9 nmol/l
Stage II	629.0 $\pm$ 279.7 and 213.5 $\pm$ 88.1 nmol/l
Stage III	2 387.0 $\pm$ 2 112.1 and 99.9 $\pm$ 32.3 nmol/l
Stage IV	3 768.0 $\pm$ 1 673.3 and 174.2 $\pm$ 66.2 nmol/l

atretic and originated in the growth wave of the preceding stage of the cycle. Several authors also point at the presence of a large follicle in each stage of the oestrous cycle (Matton et al., 1981; Ireland and Roche, 1983; Savio et al., 1993). Some researchers (Fortune et al., 1991; Knopf et al., 1989) observed follicular growth in two or even three waves. During each wave 3-6 follicles of 5 mm diameter occur (Fortune et al., 1988; Sirois and Fortune, 1988). A few days following the growth wave one of the follicles gets larger and undergoes continuous growth, whereas the smaller follicles suffer regression. Different opinions have been published on the number of growth waves occurring in the course of the bovine sexual cycle. Knopf et al. (1989) determined 2 follicular growth waves in as much as 90% of the ultrasonographically examined heifers; in the remaining animals they observed 3 waves. On the contrary, Fortune et al. (1991) observed two growth waves in 25% of the examined animals and 3 waves in the remaining ones. All authors identically observed the cycles with three follicular growth waves to be prolonged and to

have a prolonged luteal phase, and vice versa. Our study revealed increased numbers of follicles with a diameter of more than 5 mm in each stage of the cycle. These follicles became selected from the group of recruited follicles with a diameter surpassing 2 mm (Fortune et al., 1991; Driancourt, 1991). In each stage of the cycle the ovaries harbour large numbers of recruited follicles; gradually selection of that follicle occurs which is predetermined to be the dominant one. Two steps of folliculogenesis are distinguished, the so-called basal that can partly develop without gonadotropins, and the so-called tonic in the course of which gonadotropins are inevitably required. Basal folliculogenesis is subsided by the tonic one; the latter starts when follicles reach 2 mm in sheep and 4 mm in cows (Driancourt, 1991). It has been proved that it is the group of follicles larger than 4 mm of which the dominant follicle is selected, since the granulosa cells of the dominant follicle express sufficient LH receptors (Driancourt, 1991; Carson et al., 1979), display maximum responsiveness to FSH and can produce cAMP and E<sub>2</sub> (Tsonis et al., 1984; McNatty et al., 1986). It has been known for some time that the large oestrogen-dominant follicles might adversely influence the growth and development of the smaller follicles that are present on the ovary (Matton et al., 1981). Our observation confirmed that the numbers of small recruited follicles on the ipsilateral ovary were decreased when compared to the contralateral one, on which increased numbers of selected medium-sized follicles were seen. The latter fact may be explained by the increased growth rate of that follicular population from which the observed oestrogen-dominant follicles were selected.

We also recorded differences in the mean numbers of recruited and selected follicles on ovaries harbouring an active CL. The negative effect of the CL on the ipsilateral ovary upon growth of the recruited and partly also of the selected follicles, as seen in this study, coincides with the findings of Bellin et al. (1984) and Taylor and Rajamahendran (1991) who reported a direct inhibitory effect of the CL on follicular development. Matton et al. (1981) claimed the numbers of medium-sized follicles on the ovary without a CL to be increased when compared with a CL-harboring ovary. During the luteal phase, large follicles (10–20 mm) on the ovary with a CL were shown to have significantly decreased oestrogen concentrations (Brantmeier et al., 1984) when compared to follicles on the ovary without a CL. We did not succeed to confirm this relation; oestrogen concentrations in our work depended on the steroid dominance and the degree of follicular atresia. Our observations revealed that except for the stages IV and I, the presence of a large oestrogen-dominant follicle on the ipsilateral ovary had an adverse effect on the occurrence of large (> 10 mm) and small (< 4.9 mm) follicles. On the contrary, when a large oestrogen-dominant follicle was present, more 4.9–9.9 mm follicles were found on the ipsilateral than on the contralateral ovary. We suppose that, to a certain extent,

oestradiol 17-beta produced by the oestrogen-dominant follicle may support the selection of a certain proportion of recruited follicles. As an FSH antagonist, however, it may slow down the recruitment of small (< 4.9 mm) follicles.

The results of our study revealed the presence of the large oestrogen-dominant follicle to have negative effects on the presence of another large follicle on the ovary and on the recruitment of small (< 4.9 mm) follicles. In contrast to this, the presence of a large oestrogen-dominant follicle positively influenced the occurrence of 5–9.9 mm follicles in all stages of the cycle. No effects of the CL were observed on the presence of medium-sized and large follicles. Although the differences were insignificant, negative effects of the CL were observed in relation to the occurrence of small (< 4.9 mm) follicles.

### Acknowledgements

The authors wish to thank Mrs. G. Gréserová-Tkáčiková, M. A., for translating the article into English.

### References

- BELLIN, M. E. – MINSHELWOOD, M. M. – HAUSER, E. R. – AX, R. L.: Influence of suckling and side of corpus luteum or pregnancy on folliculogenesis in postpartum cows. *Biol. Reprod.*, 31, 1984: 849–855.
- BRANTMEIER, S. A. – BELLIN, M. E. – BOEHM, S. K. – BUSHMEYER, S. M. – KUBAJAK, C. L. – DENTINE, M. – GRUMMER, R. R. – AX, R. L.: Influence of stage of cycle, corpus luteum location, follicle size and number of large follicles on estradiol 17  $\beta$  concentration in bovine follicles. *J. Dairy Sci.*, 70, 1984: 2138–2144.
- CALLESEN, H. – GREVE, T. – HYTTEL, F.: Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, 25, 1986: 71–86.
- CARSON, R. S. – FINDLAY, J. K. – BURGER, H. G. – TROUNSON, A. O.: Gonadotropin receptors of the bovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol. Reprod.*, 21, 1979: 75–87.
- DRIANCOURT, M. A.: Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, 35, 1991: 55–79.
- FORTUNE, J. E. – SIROIS, J. – QUIRK, S. M.: The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine oestrous cycle. *Theriogenology*, 29, 1988: 95–110.
- FORTUNE, J. E. – SIROIS, J. – TURZILLO, A. M. – LAVOIR, M.: Follicle selection in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil.*, 43, 1991: 187–198.
- IRELAND, J. J. – MURPHEE, E. L. – COULSON, P. B.: Accuracy of predicting stage of bovine oestrous cycle by cross appearance of the corpus luteum. *J. Anim. Sci.*, 63, 1980: 155–160.
- IRELAND, J. J. – ROCHE, J. F.: Development of nonovulatory antral follicles in heifers: Changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*, 112, 1983: 150–156.

- KNOPF, L. – KASTELIC, J. P. – SCHALLENBERGER, E. – GINTHER, O. J.: Ovarian follicular dynamics in heifers: Test of two wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 6, 1989: 111–119.
- KOLENA, J. – CHANNING, C. P.: Stimulatory effects of LH, FSH and prostaglandins upon cyclic 3,5-AMP levels in porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 90, 1972: 1543–1550.
- LAZÁR, L. – ELEČKO, J. – MARAČEK, I.: Vplyv steroidnej dominancie na koncentrácie cAMP, cGMP, progesterónu a 17  $\beta$  estradiolu v tekutine najväčšieho folikulu. *Veter. Med. (Praha)*, 35, 1990: 641–646.
- LAZÁR, L. – HAJURKA, J.: Koncentrácie cAMP, cGMP, 17 beta-estradiolu a progesterónu vo folikulárnej tekutine najväčšieho folikulu kráv z folikulárnej fázy pohlavného cyklu a po superovulačnom ošetrení so sérovým gonadotropínom. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991: 385–392.
- MATTON, P. – ADELAKOUN, V. – COUTURE, Y. – DUFOUR, J. J.: Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the oestrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 52, 1981: 813–820.
- McNATTY, K. P. – LUN, S. – HEATH, D. A. – BALL, K. – SMITH, P. – HUDSON, N. L. – McDIARMIO, J. – GIBB, M. – HENDERSON, K. M.: Ovarian activity in Booroola by the Merino ewes which were homozygous, heterozygous and non carriers of a major gene influencing their ovulation rate. *J. Reprod. Fertil.*, 77, 1986: 193–205.
- RAJAKOSKI, E.: The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. *Acta Endocrin.*, 52, 1960: 7–68.
- ROBINSON, G. A. – BUTCHER, R. W. – SUTHERLAND, E. W.: On the relation of hormone receptors to adenylyl cyclase. In: DANIELLE, J. F. – MORAN, J. F. – TRIGGLE, D. J.: Fundamental concept in drug receptor interaction. New York, Academic Press 1970: 59–91.
- SAVIO, J. D. – THATCHER, W. W. – BADINGA, L. – de la SOTA, R. L. – WOLFENSON, D.: Regulation of dominant follicle turnover during oestrous cycle in cows. *J. Reprod. Fertil.*, 97, 1993: 197–203.
- SIROIS, J. – FORTUNE, J. E.: Follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.*, 39, 1988: 308–317.
- SOĀAL, R. R. – ROHLF, F. J.: Biometry. The principles and practices of statistics in biological research. San Francisco, Freeman and Co. 1969.
- TAYLOR, C. – RAJAMAHEDRAN, R.: Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 74, 1991: 115–123.
- TSONIS, C. G. – CARSON, R. S. – FINDLAY, J. K.: Relationships between aromatase activity, follicular fluid estradiol 17  $\beta$  and testosterone concentrations and diameter and atresia of individual ovine follicles. *J. Reprod. Fertil.*, 72, 1984: 153–163.

Arrived on 8th March 1994

LAZÁR, L. – MARAČEK, I. (Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice):

**Rast a vývoj folikulov kráv v rôznych fázach pohlavného cyklu v závislosti od prítomnosti žltého telieska alebo estrogén-dominantného folikulu.**

Vet. Med. – Czech, 39, 1994 (11): 653–661.

V práci sa zisťovala a porovnávala miera regrutácie a rastu folikulov ako aj kvalita najväčších folikulov v rôznych štádiách pohlavného cyklu kráv (štádium I: 1.–4. deň, II: 5.–10. deň, III: 11.–17. deň, IV: 18.–21. deň) v závislosti od prítomnosti žltého telieska resp. estrogén-dominantného folikulu na vaječníku.

Najväčší podiel malých folikulov (< 4,9 mm) je v štádiu IV (93,4 %), stredne veľkých (5,0–9,9 mm) v štádiu I (16,6 %) a veľkých (> 10 mm) v štádiu III (4,8 %).

Z výsledkov vyplýva, že prítomnosť veľkého estrogén-dominantného folikulu má negatívny vplyv na prítomnosť ďalšieho veľkého folikulu na vaječníku ako aj na regrutáciu malých folikulov do 5 mm. Naopak, prítomnosť veľkého estrogén-dominantného folikulu má vo všetkých štádiách pozitívny vplyv na prítomnosť selektovaných folikulov veľkosti 5,0–9,9 mm. Vplyv žltého telieska na prítomnosť folikulov väčších ako 5 mm bol indiferentný. I keď rozdiely neboli štatisticky významné, prítomnosť žltého telieska na vaječníku mala negatívny vplyv na prítomnosť regrutovaných folikulov menších ako 4,9 mm.

krava; pohlavný cyklus; folikuly; žlté teliesko; estrogén-dominantné folikuly

---

*Contact Address:*

MVDr. Ladislav L a z á r, CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny,  
Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovak Republic  
Tel.: 095/352 95, fax 095/318 53

---

## **INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION**

**Slezská 7 CS 120 56 Praha 2 Czech Republic**

**Fax: (00422) 25 70 90**

---

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

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

---

Periodical	Number of	
	issues per year	pages
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	96
Veterinární medicína (Veterinary Medicine)	12	64
Živočišná výroba (Animal Production)	12	96
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	96
Lesnictví (Forestry)	12	48
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4	80
Ochrana rostlin (Plant Protection)	4	80
Genetika a šlechtění (Genetics and Plant Breeding)	4	80
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	80
Potravinářské vědy (Food Sciences)	6	80

---

# ZDOKONALENIE LABORATÓRNEJ DIAGNOSTIKY BESNOTY A TITRÁCIE VÍRUSU BESNOTY

J. Zavadová<sup>1</sup>, Š. Švrček<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice

<sup>2</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

Pre primárnu izoláciu a titráciu uličných kmeňov vírusu besnoty z mozgov podozrivých zvierat sme použili test, ktorý bol pripravený na bunkovej kultúre BHK-21/C 13 (rabický infekčný test – RTCIT). Zistili sme, že tento test je spoľahlivý a jeho citlivosť je zrovnateľná so štandardným myším inokulačným testom. Týmto testom sme dostali výsledky za 24–48 hodín na Lab-Tek komôrkach. Zistili sme, že pridanie DEAE-dextranu k bunkovej kultúre iba nepatrne zvýšilo invazívnosť vírusu v testovaných vzorkách. Tu popísaná metóda je schopná nahradiť myšiu inokulačnú test (MIT). V našom laboratóriu touto metódou sme vyšetrili 20 vakcinačných kmeňov vírusu besnoty Vnukovo-32/107 a 25 uličných kmeňov vírusu besnoty (zaslaných z terénu) – pôvodné líščie mozgové suspenzie. Z týchto bolo 10 mozgových suspenzií negatívnych pri laboratórnom vyšetrení (PMIF, RTCIT tak aj MIT metódami).

vírus besnoty; bunky BHK-21/C 13 (baby hamster kidney cell); priama metóda imunofluorescencie (PMIF); myšiu inokulačnú test (MIT); rabický infekčný test na bunkovej kultúre (RTCIT)

Besnota zvierat a ľudí, s ohľadom na mimoriadny epizootologický, epidemiologický, ekonomický, ekologický a etický význam, je predmetom záujmu nielen terénnych zložiek veterinárnej a zdravotnej služby, ale tiež laboratórnej praxe i výrobcov biopreparátov, výskumu a vývoja. Prevencia a tlmenie pri besnote sa vykonáva komplexne, s využitím viacerých metód – jednak všeobecných protinákazových opatrení, jednak imunoprofylaxie, ktorá má rozhodujúci význam. Predpokladom pre úspešné vykonávanie účinných protinákazových opatrení aj pri besnote je diagnostika, zvlášť laboratórna.

Laboratórna diagnostika sa vykonáva v intenciách doporučení WHO (1984, 1992). Vznikajú problémy v prípade, ak pri laboratórnom vyšetrení pri podozrení na besnotu je indikované vykonanie izolácie vírusu v zmysle doporučení WHO (1992), vykonanie izolačného pokusu je indikované u zvierat, ktoré exponovalo človeka alebo domáce zviera a pri detekcii rabického antigénu priamou metódou imunofluorescencie (PMIF) bol zistený negatívny výsledok. Inokulačný test na

myšiach (MIT) má viaceré nedostatky, zvlášť dlhodobé pozorovanie infikovaných zvierat, tiež vysoké náklady. Pri vykonávaní MIT vznikajú ekologické a etické problémy. Preto je snaha nahradiť tento izolačnými postupmi *in vitro* (S m i t h , 1991).

Pri výrobe antirabickej vakcíny dôležitou súčasťou medzioperačnej kontroly, pre posúdenie vhodnosti vírusovej suspenzie (polotovaru) pre jej využitie v ďalšom technologickom postupe, je nutné stanovenie titru vírusu. Vykonávanie tejto kontroly MIT pre jeho časovú náročnosť je nevhodné. S ohľadom na tieto skutočnosti je potrebné vykonávať túto operáciu v teste *in vitro*. Navyiac, ak sa testujú bunkové suspenzie vakcinačného kmeňa, je to mimoriadne perspektívne, zvlášť s ohľadom na skutočnosť, že tieto sú adaptované na bunkové kultúry.

Výber metód detekcie a kvantifikácie rabického vírusu sa podstatne rozšíril v súvislosti s možnosťou využitia bunkových kultúr. Pre *in vitro* testy sú doporučené rôzne stabilné bunkové línie.

Pre primárnu izoláciu rabického vírusu R u d d a i. (1980) použili modifikovanú techniku bunkovej kultivácie – rabický infekčný test na bunkovej kultúre (RTCIT). Test vykonali na BHK-21 bunkách v ôsmich komôrkových sklíčkach pre kultiváciu buniek. Pre izoláciu a pomnoženie uličného a fixného vírusu besnoty U m o h a B l e n d e n (1983) použili bunkové kultúry z obličiek skunkov (BCK) a obličiek medvedíka čistotného (RKC), ako aj z mozgu skunkov (SBC).

R u d d a T r i m a r c h i (1989) vyvinuli a zdokonalili *in vitro* izolačný postup pre uličné kmene rabického vírusu. Kultiváciu vykonávali na myších neuroblastomových bunkách a výsledky porovnávali s MIT. Podľa nimi dosiahnutých výsledkov, MIT môže byť nahradený *in vitro* postupom RTCIT pre rutinnú laboratórnu diagnostiku besnoty. Podobné výsledky dosiahol aj W e b s t e r (1987). T a t a r o v a i. (1987) zaznamenali sľubné výsledky pri použití neuroblastomovej pasážovateľnej bunkovej línie NGUK-1 pre primoizoláciu (detekciu) uličných kmeňov vírusu besnoty. Doporučujú túto pre laboratórnu diagnostiku besnoty.

Cieľom našich pokusov bolo zdokonalenie laboratórnej diagnostiky a titrácie vírusu besnoty, menovite:

- Optimalizovať podmienky pre využitie *in vitro* metódy (rabický infekčný test na bunkovej kultúre – RTCIT) pre kvantifikáciu (titráciu) vakcinačného kmeňa vírusu besnoty, ako náhrady *in vivo* metódy (myšieho inokulačného testu – MIT).
- Optimalizovať podmienky pre využitie *in vitro* metódy pre primoizoláciu uličného vírusu besnoty, ako náhrady *in vivo* metódy – MIT.
- V porovnávacích pokusoch (MIT a RTCIT) overiť diagnostickú efektívnosť, resp. citlivosť *in vivo* metódy a optimalizovaného RTCIT pri vakcinačných a uličných rabických kmeňoch.

## MATERIÁL A METÓDY

### KMENE VÍRUSU BESNOTY

1. Vakcinačný rabický kmeň Vnukovo-32 na úrovni 107. sériovej bunkovej pasáže. V pokusoch boli použité jednak bunkové vírusové suspenzie (infekčné bunkové médium) kmeňa Vnukovo-32/107 dodané z Mevaku Nitra v rámci spolupráce pri vývoji a kontrole orálnej antirabickej vakcíny a jednak vírusové suspenzie pripravené v našom laboratóriu. Celkovo bolo vyšetrených 20 vírusových suspenzií. Titračné pokusy boli vykonané paralelne dvomi postupmi – MIT (K o p r o w s k i , 1973) a RTCIT (R u d d a i . , 1980). Pritom RTCIT bol nami parciálne modifikovaný a optimalizovaný.

2. Uličné kmene vírusu besnoty v celkovom počte 15, vo forme pôvodných líščích mozgových suspenzií. Líšky boli odlovené v rámci kontrolných vyšetrení v zónach orálnej antirabickej vakcinácie na Slovensku a pôvodne dodané do ŠVÚ v Bratislave a v Košiciach. Z ŠVÚ v Bratislave sme získali 10 kmeňov a z ŠVÚ v Košiciach päť kmeňov. Vo všetkých 15 prípadoch vyšetrenie otláčkových preparátov z líščích mozgov PMIF na detekciu rabického antigénu bolo pozitívne.

Okrem toho bolo vyšetrených ďalších 10 líščích mozgových suspenzií pripravených z mozgu zvierat zaslaných z terénu na laboratórne vyšetrenie pri podozrení na besnotu, negatívnych pri detekcii rabického antigénu PMIF.

3. Pre porovnanie bol použitý laboratórny kmeň CVS/Paríž adaptovaný na BHK-21 bunkovú kultúru, získaný z Institut Pasteur v Paríži, pomnožený v našom laboratóriu.

### PRÍPRAVA SUSPENZIÍ

Testované suspenzie líščích mozgov sme pripravili v 30% koncentrácii a scentrifúgovali pri 3000 g po dobu 30 minút v chladenej centrifúge. Supernatant suspenzie sme ďalej riedili (násobok riedenia 10) v rastovom médiu MEM s 10% ITS.

### MYŠÍ INOKULAČNÝ TEST (MIT)

Izolácie a titrácie rabických vírusov *in vivo* sme vykonali na bielych myšiach o hmotnosti 6–8 gramov. Myši sme inokulovali intracerebrálne, objem inokula 0,03 ml (K o p r o w s k i , 1973) desaťnásobnými riedeniami testovaných suspenzií. Myši sme pozorovali najmenej 21 dní. Z uhynutých myší, resp. usmrtených v štádiu prostrácie, sme pripravili otláčkové preparáty, ktoré sme kontrolne vyšetřili PMIF na dôkaz rabického antigénu. Log MICLD<sub>50</sub> sme vypočítali podľa R e e d a a M u e n c h a (1938).

Otlačkové preparáty z mozgu experimentálne infikovaných myší sme pripravili a vyšetrili obvyklým spôsobom podľa Deana a Abelsetha (1973) na prítomnosť antigénu vírusu besnoty.

## BUNKOVÁ KULTÚRA

V testoch sme použili stabilnú bunkovú líniu BHK-21/C 13 (Imuna Šarišské Michaľany), ktorú sme kultivovali v minimálnom esenciálnom médiu (MEM) podľa Eagle (ÚSOL Praha) v modifikáciách D-MEM a E-MEM s pridaním 5–10 % inaktivovaného teľacieho séra – ITS (Bioveta Ivanovice) pre rastové médium (1 % pre udržiavacie médium). Do médii sme pridali 100 IU PNC, 200 mg STM a 40 µg gentamycínu na ml média, pH média sme upravili pomocou 7,5% NaHCO<sub>3</sub> na 7,0–7,6. Bunky sme pomnožovali na kultivačných fľašiach sklenených fy Roux a plastických fy Nunc. Po vytvorení bunkovej jednovrstvy sme túto strypsinizovali do rastového média a uložili pri teplote 4 °C až do použitia (maximálne na 7 dní). Koncentráciu buniek sme upravili na 200 000–800 000 buniek v ml. Pri použití variantu infekcie buniek v suspenzii, roztok DEAE-dextranu sme pridali k suspenzii buniek 10–50 µg/ml kultivačného média s bunkami. Pri použití variantu infekcie porastenej jednovrstvy, roztok DEAE-dextranu sme pridali (bezprostredne pred inokuláciou), k testovanej vírusovej suspenzii. Nariedenú suspenziu buniek (s pridaným DEAE-dextranom resp. bez neho) sme inokulovali v objeme 200 µl do každej komôrky Lab-Tek sklíčka.

## RABICKÝ INFEKČNÝ TEST NA BUNKOVEJ KULTÚRE (RTCIT)

Isolácie a titrácie vírusov sme vykonávali na ôsmich komôrkových Lab-Tek sklíčkach (Lab-Tek Products Div. Miles Laboratories Inc. Naperville, USA). Pri variante infekcie buniek v suspenzii z každej vyšetrovanej vzorky vírusovej suspenzie – neriedenej (supernatant 10–30% mozgovej suspenzie, resp. bunkové infekčné médium), alebo v desaťnásobnom sériovom riedení sme pridali na jednotlivé komôrky v objeme 50–200 µl.

Obsah komôrky (bunky, DEAE-dextran a inokulum supernatantu mozgovej suspenzie, resp. testovaného infekčného bunkového média) sme jemne premiešali a sklíčka sme prikryli plastickými vrchnákmi a potom inkubovali (adsorbovali) 60 minút pri izbovej teplote. Potom sme odsali bunkové médium, (ktoré obsahovalo DEAE-dextran) a nahradili ho novým rastovým médiom (bez DEAE-dextranu). Inkubáciu sme vykonali v termostate s 5% denzitou CO<sub>2</sub> vo vlhkej komôrke pri teplote 32–37 °C po dobu 24–48 hodín. Pri variante infekcie vytvorenej bunkovej jednovrstvy sme postupovali analogicky.

Rabický antigén sme detekovali priamou metódou imunofluorescencie – PMIF (Dean, Abelseth, 1973). Z komôrok sme odstránili plastikový rám a sklíčka vysušili v laminárnom boxe. Po usušení sme sklíčka fixovali v acetóne pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 minút. Sklíčka sme usušili pri izbovej teplote v laminárnom boxe a ofarbili vysýteným antirabickým konjugátom (Bioveta Ivanovice) po dobu 45 minút pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  v termostate vo vlhkej komôrke, premyli vo fosfátovom pufre pH 7,4–7,6 a nakoniec jemne ponorili na 1 minútu do destilovanej vody, vysušili a vyšetrili pod fluorescenčným mikroskopom pri 100 až 200násobnom zväčšení.

Za konečné riedenie sme považovali to riedenie, pri ktorom bola pozorovaná špecifická fluorescencia aspoň v jednej bunke.

Experimentálnu časť práce je možné rozdeliť na dve etapy. V prvej časti (A) – predpokusy, sme optimalizovali podmienky vykonania RTCIT, v druhej časti (B) – vlastné pokusy, sme stanovili citlivosť RTCIT pre detekciu a kvantifikáciu kmeňov rabického vírusu.

#### A. Predpokusy

- optimalizovanie podmienok vykonania RTCIT. Podmienky kultivácie bunkovej kultúry BHK 21/C13 :
- Optimalizácia koncentrácie (resp. dávky, počtu) buniek na komôrku. Pri štandardnom objeme inokula – 200  $\mu\text{l}$  na komôrku boli zvolené variantné počty buniek 40 000, 80 000, 160 000.
- Výber vhodného bunkového média (z cenove dostupných). Bola overená vhodnosť využitia MEM podľa Eaglea (ÚSOL Praha), v modifikácii E-MEM resp. D-MEM s následnou úpravou pH variantne na hodnoty 7,0; 7,2; 7,4; 7,6 pomocou 7,5% roztoku  $\text{NaHCO}_3$ .
- Stanovenie optimálneho podielu (%) pridania ITS do bunkového média. Variantne bol zvolený podiel – percentuálny objem – 5,0 resp. 10 %.
- Stanovenie optimálnej koncentrácie pridaného DEAE-dextranu (v prepočte na celkový objem inokula 400  $\mu\text{l}$  na komôrku). Variantne bol zvolený podiel 10, 25 a 50  $\mu\text{g/ml}$ .
- Stanovenie optimálnej teploty kultivácie buniek: boli zvolené teplotné režimy  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  resp.  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pri horeuvedených podmienkach bola hodnotená rýchlosť tvorby bunkovej jednovrstvy a zachovanie charakteristického tvaru buniek.

Optimalizácia vykonania RTCIT:

- Výber vhodného objemu inokula vírusovej suspenzie. Variantne boli overené objemy 50, 100, resp. 200  $\mu\text{l}$  na komôrku.

Overenie vhodnosti alternatívnych spôsobov infikovania buniek – infikovanie vytvorenej bunkovej jednovrstvy resp. infikovanie buniek v suspenzii.

I. Výsledky titrácie vakcinačného kmeňa Vnukovo-32/107 (infekčné bunkové médium) intracerebrálnym inokulačným testom na myšiach (MIT) a rabickým infekčným testom na bunkovej kultúre (RTCIT) – Results of titration of vaccination strain Vnukovo-32/107 (infectious cell medium) through the intracerebral inoculation test conducted with mice (MIT – the murine inoculation test) and rabies infection test on cell tissue culture (RTCIT)

Pôvod vírusovej suspenzie <sup>1</sup>	Číslo vzorky <sup>2</sup>	Titer vírusu <sup>3</sup> (log)	
		RTCIT	MIT
LPL ÚEVM Košice	1	10 <sup>5,7</sup>	10 <sup>4,2</sup>
	2	10 <sup>5,9</sup>	10 <sup>5,1</sup>
	3	10 <sup>6,0</sup>	10 <sup>4,7</sup>
	4	10 <sup>5,5</sup>	10 <sup>4,7</sup>
	5	10 <sup>5,3</sup>	10 <sup>4,6</sup>
	6	10 <sup>5,3</sup>	10 <sup>4,2</sup>
	7	10 <sup>6,1</sup>	10 <sup>4,9</sup>
	8	10 <sup>5,4</sup>	10 <sup>4,4</sup>
	9	10 <sup>6,2</sup>	10 <sup>4,8</sup>
	10	10 <sup>6,0</sup>	10 <sup>4,4</sup>
CVS/Paríž – kontrola <sup>4</sup>		10 <sup>7,0</sup>	10 <sup>5,0</sup>
Priemer <sup>5</sup>		10 <sup>5,7</sup>	10 <sup>4,6</sup>

<sup>1</sup>origin of virus suspension, <sup>2</sup>sample No., <sup>3</sup>titre of virus (log), <sup>4</sup>CVS/Paris – control, <sup>5</sup>average

Pri horeuvedených alternatívnych podmienkach vykonania RTCIT, bola hodnotená rýchlosť detekcie rabického antigénu PMIF (resp. pomnoženie vírusu), citlivosť testu a pracovnosť.

## B. Vlastné pokusy

- určenie citlivosti RTCIT pre detekciu (primoizoláciu a identifikáciu) a kvantifikáciu kmeňov vírusu besnoty.
- Pre vykonanie porovnávacích pokusov (postupmi RTCIT a MIT) bol nami použitý RTCIT v optimalizovanom variante, na základe predtým vykonaných predpokusov (viď A).
- Bolo vykonané komparatívne zhodnotenie citlivosti (diagnostickej efektívnosti) nami optimalizovaného RTCIT a klasickej *in vivo* metódy – intracerebrálneho MIT. V pokusoch bolo použitých 35 rabických „kmeňov“ (15 uličných kmeňov) a 20 zberov infekčného bunkového média vakcinačného kmeňa Vnukovo-32/107, tiež 10 mozgových suspenzií notoricky besnoty prostých zvierat.

II. Výsledky titrácie vakcinačného kmeňa Vnukovo-32/107 (infekčné bunkové médium) intracerebrálnym inokulačným testom na myšiach (MIT) a rabickým infekčným testom na bunkovej kultúre (RTCIT) – Results of titration of vaccination strain Vnukovo-32/107 (infectious cell medium) through the intracerebral inoculation test in mice (MIT) through the intracerebral inoculation test conducted with mice (MIT) and rabies infection test on cell tissue culture (RTCIT)

Pôvod vírusovej suspenzie <sup>1</sup>	Číslo vzorky <sup>2</sup>	Titer vírusu <sup>3</sup> (log)	
		RTCIT	MIT
Mevak Nitra	4	10 <sup>5,7</sup>	10 <sup>4,2</sup>
	5	10 <sup>5,1</sup>	10 <sup>4,2</sup>
	6	10 <sup>5,3</sup>	10 <sup>4,2</sup>
	11	10 <sup>4,6</sup>	10 <sup>3,3</sup>
	12	10 <sup>5,6</sup>	10 <sup>4,5</sup>
	13	10 <sup>6,1</sup>	10 <sup>5,3</sup>
	14	10 <sup>6,2</sup>	10 <sup>5,3</sup>
	16	10 <sup>5,7</sup>	10 <sup>4,5</sup>
	24	10 <sup>4,8</sup>	10 <sup>3,6</sup>
	25	10 <sup>6,0</sup>	10 <sup>5,2</sup>
Priemer <sup>4</sup>		10 <sup>5,5</sup>	10 <sup>4,4</sup>
Priemer spolu z tab. I a II <sup>5</sup>		10 <sup>5,6</sup>	10 <sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>origin of virus suspension, <sup>2</sup>sample No., <sup>3</sup>titre of virus (log), <sup>4</sup>average, <sup>5</sup>average in total from Tabs. I and II

## VÝSLEDKY

**A. Výsledky predpokusov zameraných na optimalizáciu podmienok pre vykonanie RTCIT, je možné zhrnúť nasledovne:**

- Pri štandardnom objeme inokula buniek 200 µl na komôrku, optimálnym počtom je 80 000.
- Z dostupných kultivačných médií je vhodné MEM médium podľa Eaglea v modifikácii podľa Dulbecca (D-MEM) s následnou úpravou pH pomocou 7,5% roztoku NaHCO<sub>3</sub> na hodnotu pH 7,2.
- Pre adekvátnu rýchlosť tvorby bunkovej jednovrstvy ako optimálny podiel pridania ITS do bunkového média je 10 %.
- Optimálnou teplotou pre kultiváciu buniek je 37 °C, tiež pre pomnožovanie vírusu.
- Optimálnou koncentráciou DEAE-dextranu (pridaného približne 10 minút pred infikovaním vírusom) sa javí 25 µg/ml vo výslednej koncentrácii.

III. Výsledky titrácie uličných kmeňov vírusu besnoty intracerebrálnym inokulačným testom na myšiach (MIT) a rabickým infekčným testom na bunkovej kultúre (RTCIT) – Results of titration of street strains of rabies virus through the intracerebral inoculation test conducted with mice (MIT) and rabies infection test on cell tissue culture (RTCIT)

Pôvod vírusovej suspenzie <sup>1</sup>	Číslo vzorky <sup>2</sup>	Titer vírusu <sup>3</sup> (log)	
		RTCIT	MIT
Líška obyčajná <sup>4</sup>	R-576	10 <sup>4,7</sup>	10 <sup>2,5</sup>
	R-580	10 <sup>1,9</sup>	10 <sup>2,7</sup>
	R-587/18	10 <sup>3,4</sup>	10 <sup>3,4</sup>
	R-560/92	10 <sup>2,5</sup>	10 <sup>3,5</sup>
	53/93	10 <sup>4,3</sup>	10 <sup>2,9</sup>
	679	10 <sup>1,7</sup>	10 <sup>1,7</sup>
	R-534	10 <sup>2,8</sup>	10 <sup>2,8</sup>
	R-597	10 <sup>3,5</sup>	10 <sup>3,5</sup>
	645	10 <sup>2,6</sup>	10 <sup>3,6</sup>
	R-567	10 <sup>3,7</sup>	10 <sup>3,7</sup>
	č. 1	10 <sup>3,1</sup>	10 <sup>2,9</sup>
	č. 2	10 <sup>3,3</sup>	10 <sup>3,3</sup>
	č. 3	10 <sup>2,2</sup>	10 <sup>3,4</sup>
	č. 4	10 <sup>3,8</sup>	10 <sup>1,5</sup>
	č. 5	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2,3</sup>
Priemer <sup>5</sup>		10 <sup>3,12</sup>	10 <sup>2,84</sup>

Titer vírusu – Titre of virus:

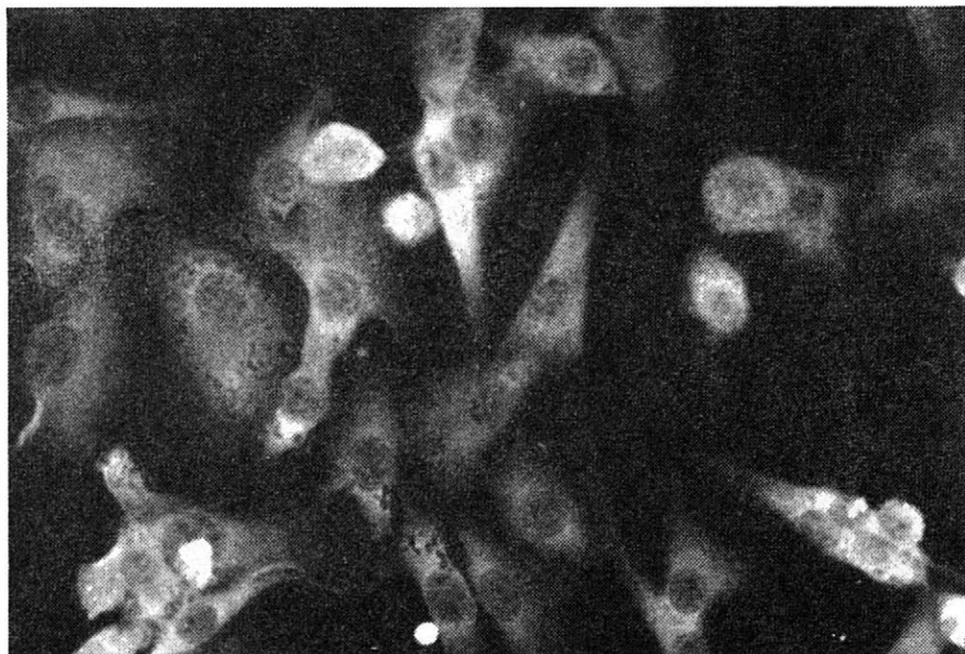
RTCIT : MIT = 33,33 % (vyšší – higher)

RTCIT : MIT = 46,67 % (rovnaký – identical)

RTCIT : MIT = 20,00 % (nižší – lower)

<sup>1</sup>origin of sample, <sup>2</sup>sample No., <sup>3</sup>titre of virus (log), <sup>4</sup>fox, <sup>5</sup>average

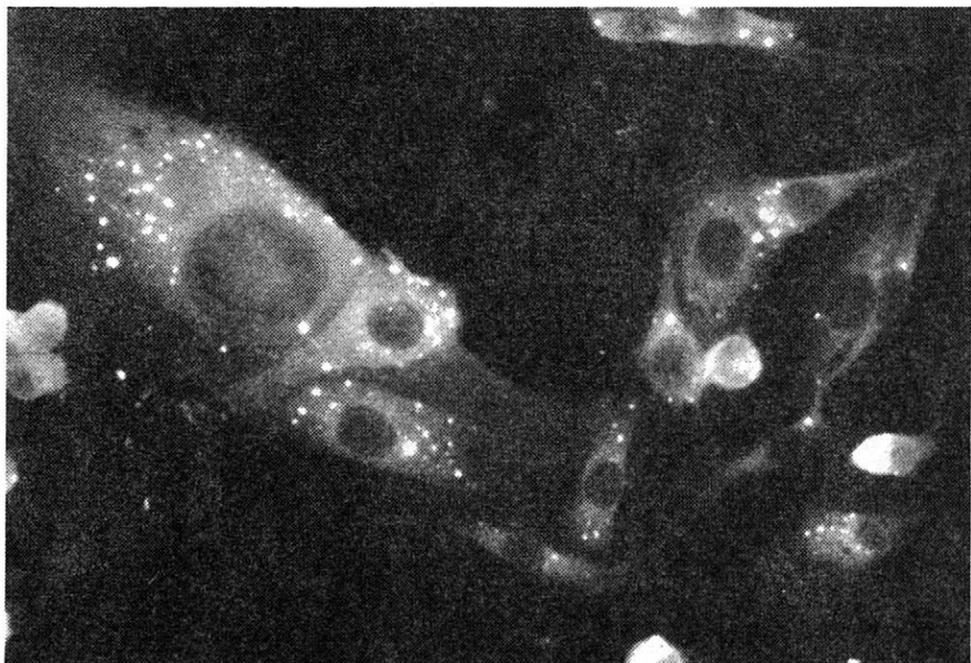
- Optimálnym objemom inokula vírusovej suspenzie pri uličných kmeňoch (supernatant mozgovej suspenzie kmeňa neadaptovaného k pomnožovaniu na bunkovej kultúre) je 200 µl na komôrku; pri vakcinačnom kmeni, adaptovanom k pomnožovaniu na bunkovej kultúre je to 100 µl.
- Pri alternatívnom spôsobe infikovania buniek testovanou vírusovou suspenziou je vhodnejší spôsob infikovania buniek v suspenzii. Takto o. i. sa časovo skráti doba vykonania RTCIT o 24–48 hodín (doba potrebná na vytvorenie bunkovej jednovrstvy).



1. Bunková línia BHK-21/C13, negatívna kontrola ofarbená PMIF, zväčšené 200x – Negative control of BHK-21/C13 cell line, staining by FAT, magnif. 200 times

**B. Výsledky vlastných pokusov:** Stanovenie citlivosti RTCIT pre detekciu a kvantifikáciu kmeňov rabického vírusu uvádzame v tab. I až III. Hodnotenie pozitívneho a negatívneho nálezu pri detekcii rabického antigénu PMIF, resp. detekcie rabického vírusu pomnoženého *in vitro*, ilustruje obr. 1 až 4.

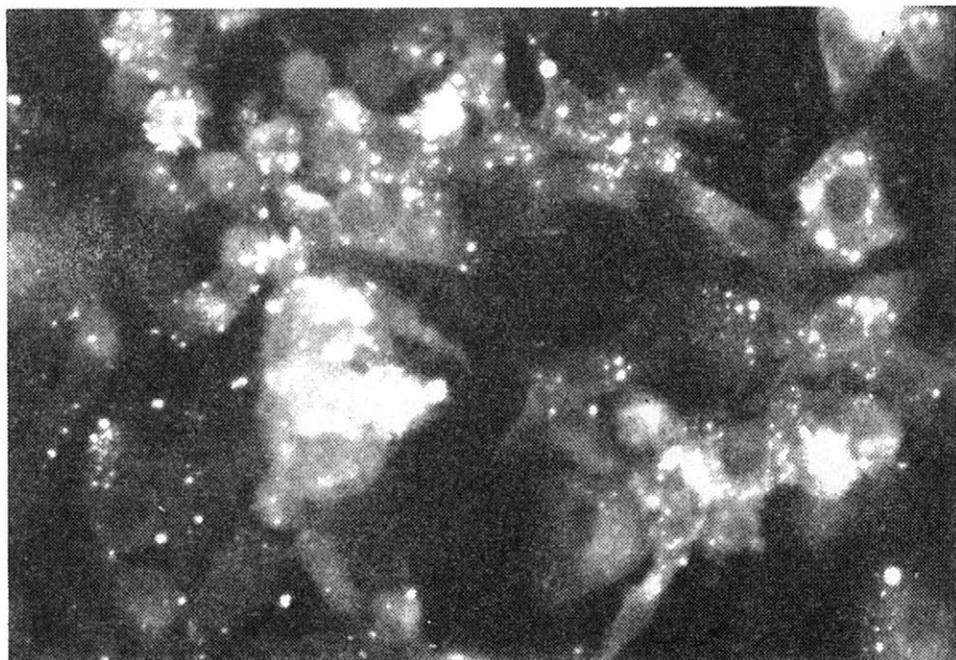
Z výsledkov uvedených v tab. I a II (porovnanie diagnostickej efektívnosti RTCIT a intracerebrálneho MIT pre titráciu vakcinačného kmeňa Vnukovo-32/107) vyplýva, že RTCIT sa vyznačuje o. i. vyššou citlivosťou. Hodnota titru vírusu vakcinačného kmeňa Vnukovo-32/107 kvantifikovaná RTCIT mala vždy vyššiu hodnotu, ako pri intracerebrálnom MIT. Pri titrácii 20 zberov infekčného bunkového média, titer vírusu kvantifikovaný RTCIT mal priemernú hodnotu vyjadrenú  $\log \text{TCID}_{50}/0,1 \text{ ml} = 10^{5,6}$ , naproti tomu pri intracerebrálnom MIT  $\log \text{MICLD}_{50}/0,03 \text{ ml} = 10^{4,5}$ . Pritom na základe porovnania „individuálnych titrov“ (resp. titrov vakcinačného kmeňa Vnukovo-32/107. z jednotlivých zberov infekčného bunkového média) je možné súdiť o korelácii hodnôt titrov zistených obidvoma metodickými postupmi. Výrazné rozdiely v hodnote titrov infekčného bunkového média (2 logaritmy) boli zistené pri kmeni CVS/Paríž, v prospech RTCIT. Tento slúžil ako kontrola – pre porovnanie.



2. Jednovrstva bunkovej línie BHK-21/C13 24 h po infekcii s vakcinačným kmeňom vírusu besnoty Vnukovo-32/107 (intracelulárne inklúzie) farbené PMIF, zväčšené 400x – Monolayer of BHK-21/C13 cell line infected with Vnukovo-32/107 24 hours postadsorption (intracellular inclusions), stained by FAT, magnif. 400 times

Z výsledkov uvedených v tab. III (porovnanie efektívnosti RTCIT a intracerebrálneho MIT pre primoizoláciu a titráciu uličných líščích kmeňov vírusu besnoty) vyplýva, že RTCIT sa o. i. vyznačuje vyššou citlivosťou. Pri titrácii 15 líščích rabických kmeňov (supernatantov mozgových suspenzií), titer vírusu kvantifikovaný RTCIT mal priemernú hodnotu vyjadrenú  $\log \text{TCID}_{50}/0,0 \text{ ml} = 10^{3,12}$ , pri intracerebrálnom MIT  $\log \text{MICLD}_{50} 0,03 \text{ ml} = 10^{2,84}$ . Z detailnejšej analýzy horeuvedených výsledkov vyplýva, že pri 33,3 % titrovaných kmeňoch RTCIT bol zaznamenaný vyšší titer ako pri MIT, pri 46,6 % boli zistené rovnaké hodnoty titrov vírusu obidvomi postupmi a v 20,0 % intracerebrálnym MIT bola zistená vyššia hodnota titru. Pri obidvoch metodických postupoch bola zaznamenaná korelácia hodnôt titrov, rovnako ako pri vakcinačnom kmeni Vnukovo-32/107 (tab. I a II).

Pri kontrolnom vyšetrení 10 líščích mozgových suspenzií, negatívnych pri detekcii rabického antigénu PMIF (v otláčkových preparátoch) obidvoma metodickými postupmi (RTCIT, resp. intracerebrálnym MIT) vo všetkých prípadoch bol zaznamenaný negatívny výsledok. Aj na základe uvedeného kontrolného

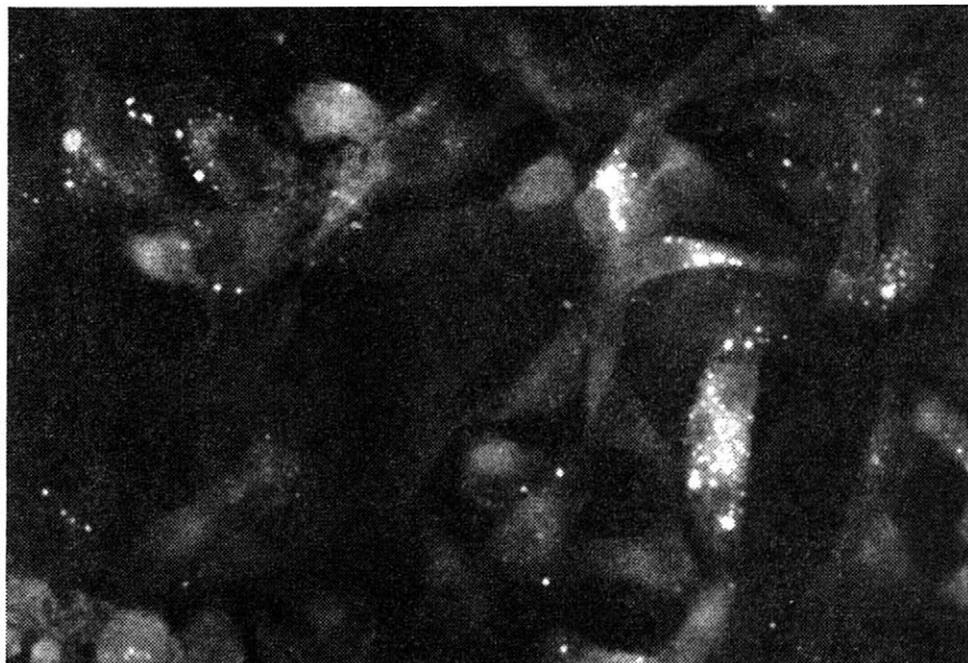


3. Jednovrstva bunkovej línie BHK-21/C13 48 h po infekcii kmeňom vírusu besnoty CVS/Paríž (perinukleárne a extracelulárne inklúzie), farbené PMIF, zväčšené 200x – Monolayer of BHK-21/C13 cell line infected with CVS/Paris, 48 hours postadsorption (perinuclear and extracellular inclusions), stained by FAT, magnif. 200 times

vyšetrenia je možné súdiť o špecificite RTCIT pri detekcii, resp. primoizolácii a kvantifikácii rabického vírusu.

## DISKUSIA

Pri diagnostike besnoty zvierat a ľudí, rozhodujúci význam má laboratórna diagnostika. V ekonomicky rozvinutých štátoch sa oficiálne registrujú len prípady výskytu besnoty potvrdené laboratórnym vyšetrením. V laboratórnej diagnostike besnoty rozhodujúci význam má detekcia rabického antigénu priamou metódou imunofluorescencie, ktorá sa vyznačuje nízkou pracnosťou, dostupnosťou a vysokou diagnostickou efektívnosťou (Dean a Abelseth, 1973; Smith, 1991; Trimarchi a Debbie, 1991). Vznikajú problémy v prípade, ak pri laboratórnom vyšetrení pri podozrení na besnotu je indikované vykonanie izolácie vírusu v zmysle doporučení WHO (1992) a ak vykonanie izolačného pokusu je indikované u zvierata, ktoré exponovalo človeka alebo domáce zviera a pri detekcii rabického antigénu priamou metódou imunofluores-



4. Jednovrstvová BHK-21/C13 bunkovej línie 48 h po infekcii uličným kmeňom vírusu besnoty (líška obyčajná) farbené PMIF, zväčšené 200x – Monolayer of BHK-21/C13 cell line infected with street strain of rabies virus (fox), 48 hours postadsorption, stained by FAT, magnif. 200 times

cencie (PMIF) bol zistený negatívny výsledok. Inokulačný test na myšiacch (MIT) má viaceré nedostatky, zvlášť dlhodobé pozorovanie infikovaných zvierat a vysoké náklady. Pri vykonávaní MIT vznikajú tiež ekologické a etické problémy. Preto je snahou nahradiť tento izoláčnými postupmi *in vitro* (Smith a i., 1991).

Rovnaké, technologické problémy vznikajú pri výrobe antirabických vakcín, pri posúdení vhodnosti polotovaru – vírusovej suspenzie vakcinačného kmeňa pre prípravu biopreparátu, na základe titrov vírusu.

Preto je snaha detekciu a kvantifikáciu rabického vírusu vykonávať *in vitro*. V súčasnosti kultivácia vírusu besnoty v rôznych bunkových systémoch je podrobne rozpracovaná. Najčastejšie pre kultiváciu vírusu besnoty sa používa pasážovateľná bunková línia obličiek sýrskych chrčkov BHK-21.

Je však známe, že bunková línia BHK-21 neumožňuje rovnakú replikáciu všetkých kmeňov vírusu besnoty. Avšak je takmer ideálna pre pomnoženie, izoláciu a titráciu vakcinačných kmeňov vírusu besnoty adaptovaných k pomnožovaniu na bunkových kultúrach. Pre uličné kmene vírusu besnoty (mozgové) je jej citlivosť nižšia.

V našich pokusoch pre krátkosť času boli vykonané na obmedzenom počte vzoriek zaslaných pre rutinné vyšetrovanie pri podozrení na besnotu. Zistili sme v zhode s niektorými autormi (Rudd a Trimarchi, 1987, 1989; Bourhy a i., 1989), že RTCIT je citlivou metódou, ktorá pri porovnaní s MIT tento môže plne nahradiť.

Počas vývoja RTCIT rôzne postupy boli odskúšané a modifikované. Podobne aj rôzne bunkové línie boli používané v experimentálnych štúdiách rabického vírusu, ale BHK-21 bunková línia a myšie neuroblastomové bunky boli a sú najčastejšie používané (Smith a i., 1978; Umoha Blenden, 1983; Wiktor a Clark, 1975; Larghi a i., 1975). Väčšina fixných, alebo laboratórnych kmeňov vírusu besnoty sa replikovala dobre na obidvoch hore spomenutých bunkových líniách, ale nie všetky uličné vírusové kmene sa replikovali rovnako dobre na BHK-21 bunkách. Na týchto bunkových líniách už po 24 hodinách bolo možné detekovať vírus besnoty ak tento bol vo vysokých koncentráciách. V prípade keď tkanivo obsahovalo málo vírusu toto bolo možné detekovať s RTCIT za 3–5 dní po infikovaní.

## Literatúra

BOURHY, H. – ROLLIN, P. E. – VINCENT, J. – SUREAU, P.: Comparative field evaluation of the fluorescent antibody test, virus isolation from tissue culture and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1989: 519–523.

DEAN, D. J. – ABELSETH, M. K.: The fluorescent antibody test. In: KAPLAN, M. M. – KOPROWSKI, H. (eds.): *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd ed. Geneva, WHO 1973: 73–84, KOPROWSKI, H.: The mouse inoculation test. In: KAPLAN, M. M. – KOPROWSKI, H. (eds.): *Laboratory Techniques in Rabies*. 3rd ed. Geneva, WHO 1973: 85–93,

LARGHI, O. P. – NEBEL, P. E. – LAZARO, L. – SAVY, U. L.: Sensitivity of BHK-21 cells supplemented with DEAE-dextran for detection of street rabies in saliva samples. *J. Clin. Microbiol.*, 1, 1975: 243–245.

REED, L. J. – MUENCH, H.: A simple method of estimating 50 percent and points. *Amer. J. Hyg.*, 27, 1938: 493–497.

RUDD, R. J. – TRIMARCHI, C. V.: Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1987: 1456–1458.

RUDD, R. J. – TRIMARCHI, C. V.: Development and evaluation of an *in vitro* virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1989: 2522–2528

RUDD, R. J. – TRIMARCHI, C. V. – ABELSETH, M. K.: Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus. *J. Clin. Microbiol.*, 12, 1980: 590–593..

SMITH, J. S.: Rabies serology. In: BAER, G. M. (ed.): *The Natural History of Rabies*. 2nd ed. Boston, CRC Press 1991: 235–252.

SMITH, A. L. – TIGNOR, G. H. – EMMONS, R. W. – WOODIE, J. D.: Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. *Intervirology*, 9, 1978: 359–361.

- TATAROV, A. G. – CHISMATULLINA, N. A. – SELIMOV, M. A. – KARMYŠEVA, V. J.: Vydelenie rabičeského vírusu u expres-diagnostika bešenstva v kultúre perevibaemých kletok nebrinomy gasserova uzla krysy. *Vopr. Virusol.*, 32, 1987: 619–621.
- TRIMARCHI, CH. V. – DEBBIE, J. G.: The fluorescent antibody in rabies. In: BAER, G. M. (ed.): *The Natural History of Rabies*. 2nd ed. Boston, CRC Press 1991: 219–233.
- UMOH, J. U. – BLENDEEN, D. C.: Comparison of primary skunk brain and kidney and racoon kidney cells with established cell lines for isolation and propagation of street rabies virus. *Infect. Immun.*, 41, 1983: 1370–1372.
- WEBSTER, W. A.: A Tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. *Can. J. Vet. Res.*, 51, 1987: 367–369.
- WIKTOR, T. J. – CLARK, H. F.: Growth of rabies virus in cell cultures. In: BAER, G. (ed.): *The Natural History of Rabies*. 1st ed. New York, Acad Press 1975: 155–179.
- WHO Expert Committee on Rabies, Tech. Report Ser., 7th, Geneva, 1984.
- WHO Expert Committee on Rabies, Tech. Report Ser., 8th, Geneva, 1992: 87.

Došlo 15. 7. 1994

ZÁVADOVÁ, J. – ŠVRČEK, Š. (Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice; University of Veterinary Medicine, Košice):

**The improvement of laboratory diagnostics of rabies and titration of rabies virus.**

*Vet. Med. – Czech*, 39, 1994 (11): 663–676.

For primary isolation and titration of street strains of the rabies virus from brains of suspected animals, an assay prepared on the cell culture BHK-21/C 13 (rabies infection test – RTCIT) was used. The above assay proved to be reliable and its sensitivity proved to be comparable to the standard mouse inoculation test. Through this test, the results were obtained within 24 to 48 hrs on Lab-Tek tissue culture chamber/slides. It was found out that DEAE-dextran added to the cell culture only slightly increased the invasiveness of the virus in the samples tested. The method described herein is able to substitute the mouse inoculation test (MIT). In our laboratory, 20 vaccination strains of the rabies virus Vnukovo-32/107 and 25 street strains of the rabies virus (delivered from the field) – original fox brain suspensions. And 10 brain suspensions were negative when tested in laboratory conditions (by PMIF, RTCIT as well as by MIT methods).

rabies virus; BHK-21/C13 (baby hamster kidney cell); direct method of immunofluorescence (PMIF); mouse inoculation test (MIT); rabies tissue culture infection test (RTCIT)

---

*Contact Address:*

MVDr. Jolana Z á v a d o v á , CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovak Republic  
Tel.: 095/320 11, fax 095/318 53

---

# PRIESKUM EFEKTÍVNOSTI NIEKTORÝCH SYSTÉMOV ČISTIARNÍ ODPADOVÝCH VÔD PRI FARMÁCH OŠÍPANÝCH NA SLOVENSKU

J. Venglovský<sup>1</sup>, P. Juriš<sup>2</sup>, J. Sokol<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice

<sup>2</sup>Parazitologický ústav SAV, Košice

<sup>3</sup>Štátna veterinárna správa Slovenskej republiky, Bratislava

Vykonal sa bakteriologický, helmintologický a fyzikálno-chemický depistážny prieskum efektívnosti technologického postupu tekutých exkrementov ošípaných v troch čistiarňach odpadových vôd (ČOV) pri veľkochovoch ošípaných (Košická Polianka, Spišské Vlachy, Veľký Ďur). Zamerali sme sa na overenie efektívnosti mechanicko-chemicko-biologického systému ČOV, ktorý je na Slovensku najviac prevádzkovaný. Na základe depistážnych vyšetrení možno konštatovať, že čistiarne odpadových vôd pri farmách ošípaných spĺňajú len vodohospodársku požiadavku, ktorá sa týka vyčistenej odpadovej vody vtekajúcej do recipienta. Z hygienického hľadiska problematickou ostáva ďalšie spracovanie resp. využitie pevnej frakcie vznikajúcej po separácii tekutých exkrementov ošípaných. V nej sú koncentrované najmä baktérie a parazitárne zárodky (*Ascaris suum*, *Trichuris suis*, *Isospora* sp.), ktorých väčšina sa vyznačuje vysokou tenacitou v životnom prostredí. Preto pevnú frakciu odpadových vôd, vznikajúcu po separácii, doporučujeme využívať k hnojným účelom až po kompostovaní. Chemická fáza technológie čistenia, ktorá nasleduje po separácii, môže pri použití niektorých koagulačných médií (síran hlinitý, síran železnatý) zaťažiť vodu predčistenú od hrubých organických nečistôt o nežiadúce chemické prvky.

farmy ošípaných; tekuté exkrementy; čistenie odpadových vôd; baktérie; vajččka helmintov; zárodky protozoí; fyzikálno-chemická analýza

Zmeny v poľnohospodárskej výrobe, ku ktorým došlo v priebehu posledných desaťročí, sú sprevádzané reálnymi i potenciálnymi problémami týkajúcimi sa kvality životného prostredia. Len ťažko možno určiť presné vzťahy medzi existujúcou poľnohospodárskou praxou a znečistením životného prostredia. Na kvalitu životného prostredia nepriaznivo dopadli dramatické zmeny aj v systéme živočíšnej výroby. Súviseli najmä s nahradzovaním malých rodinných fariem veľkokapacitnými s vysokou koncentráciou zvierat. Poľnohospodárstvo, ktorého ťažiskom je stále agro-priemyselná výroba, patrí u nás medzi najväčších znečisťovateľov životného prostredia (P o k o r n ý , 1994). Vo väčšine európskych krajín množ-

stvo odpadov z koncentrovaných fariem, najmä z chovov ošípaných a hovädzieho dobytku, je na hranici kapacity pôdy tieto odpady asimilovať (L o e h r , 1984; H o j o v e c , 1988).

Veľkochovy, hlavne farmy ošípaných, sa budovali aj u nás. Vzhľadom na svoju kapacitu majú riešenú i otázku spracovania i využitia živočíšnych exkrementov, ktorá však nie vždy plne vyhovuje hygienickým požiadavkám. Často sa stáva, že žumpy na exkrementy kapacitne nestačia, resp. čistiace zariadenie pre odpadové vody nie je dokončené alebo absentuje. Zisťujú sa preto prieniky močovky do povrchových a podzemných vôd a v okolí fariem sa šíri zápach rozkladajúcich sa exkrementov (S t r a u c h , 1980; B í l i k o v á , 1988; O n d r a š o v i č a i. , 1994).

Nesprávna manipulácia so živočíšnymi odpadmi prináša i epidemiologické problémy. Niekoľko stoviek chorôb je prenášaných zo zvierat na zvierat a viac než 150 z nich (zoonózy) môže byť prenesených na človeka. Pri ustajnení zvierat v uzavretých priestoroch patogénne zárodky vylučované aj inak než fekáliami končia v hnoji. Hnoj a hnojovicu je preto z väčších produkčných jednotiek (veľkochovov) treba považovať za infikované a pri ich využívaní a manipulácii je treba dodržiavať prísne hygienické opatrenia.

Využívanie alebo účelné zneškodňovanie hnojovice hlavne z fariem ošípaných prináša značné ekonomické, hygienické a agronomické problémy, ktoré vyplývajú nielen z prítomnosti mnohých chemických polutantov (ťažkých kovov a iných chemických zlúčenín), ale aj z jej mikrobiálnej a parazitárnej kontaminácie. Jednou z foriem spracovania tekutých odpadov zo živočíšnej výroby je ich prečistenie v čistiarnach odpadových vôd.

## MATERIÁL A METÓDA

Čistenie odpadových vôd z veľkochovu ošípaných v Košickej Polianke sa vykonáva na zariadení typu VIDUS Tatabanya (Maďarsko) s tromi za sebou nadväzujúcimi stupňami: 1. Mechanický stupeň je zabezpečený pomocou vibrosít typu GI-O (Taliansko). Separované hrubé nečistoty sa dopravujú pásovým dopravníkom na pristavenú vlečku. 2. Chemický stupeň pozostáva z prevzdušňovania, flokulácie (pomocou alulsulfátového roztoku) a zahusťovania kalu. 3. Biologický stupeň prebieha cestou aeróbnej a anaeróbnej stabilizácie.

Mechanické čistenie odpadových vôd ČOV Spišské Vlchy sa robí na bubnovom filtri a odvodňovacom lise. Chemické čistenie tekutej frakcie hnojovice sa vykonáva pomocou vápenného mlieka v chemickom reaktore, kde koagulujúce častice klesajú ku dnu. Biologický kal sa v separátore vyflotuje pridaním chloridu železitého. Zmiešaný chemický a biologický kal sa odvodňuje na pásovom lise.

Mechanicko-chemicko-biologická ČOV Veľký Ďur je skoro identická s typom prevádzkovaným v Košickej Polianke.

Z mikrobiologických ukazovateľov boli stanovené počty psychrofilných, mezofilných, koliformných a fekálnych koliformných zárodkov s použitím pevných kultivačných pôd (KA, MPA, Endov agar). Pomocou špeciálnych selektívnych pôd (Christensenov agar, XLD agar a SS agar) sa vykonali aj vyšetrenia vzoriek odpadových vôd na prítomnosť baktérií rodu *Salmonella*. Vzorky sa odoberali do sterilných sklenených fliaš podľa platnej normy. Pri mikrobiologickom vyšetrení bolo postupované podľa metód uvedených v ČSN 83 0531.

Na zisťovanie zárodkov endoparazitov v jednotlivých frakciách odpadových vôd (odpadová voda vstupujúca do procesu čistenia, pevná frakcia po mechanickej separácii, voda po chemickom čistení, aktívny kal z bioreaktora) sme použili metódu podľa Č e r e p a n o v a (1982). Zakladá sa na princípe spracovania pevnej frakcie vzorky sedimentáciou a flotáciou s roztokom o mernej hmotnosti 1 350. Vyflotované vajčička, resp. oocysty, sme zachytávali na sklenenú platničku rozmerov 5 x 5 cm. Tekutú frakciu a vodu sme vyšetrovali sedimentačne, s flotovaním sedimentu a filtrovaním supernatantu cez membránový filter pomocou vodnej vývevy (O c k e r t, 1968 – cit. J í r o v e c, 1977).

Fyzikálno-chemickú analýzu odpadových vôd z fariem ošísaných sme vykonávali nasledovnými metódami:

pH: elektrometrická metóda podľa ČSN 83 0540, časť 6. Stanovenie sa vykonalo v homogenizovanej vzorke do 24 hodín po odbere.

Rozpusťné a nerozpusťné látky (RL a NL): Zakladá sa na odparení známeho množstva homogénnej vzorky na vodnom kúpeli, vysušení odparku pri teplote 105 °C a jeho zväžení (ČSN 83 0540, časť 3).

Chemická spotreba kyslíka CHSK-Cr: Použitá metóda sa zakladá na oxidácii organických látok dvojchromanom draselným počas dvojhodinového varu v prostredí kyseliny sírovej za prítomnosti strieborných a ortuťových iónov. Množstva spotrebovaného dvojchromanu sa zistí titráciou roztokom síranu diamónno-železnatého na indikátor ferroín. Výsledok sa vyjadruje hmotnosťou kyslíka v mg ekvivalentnou spotrebovanému dvojchromanu na 1 l vzorky (ČSN 83 0540, časť 8). Analyzovali sa homogenizované vzorky.

Biochemická spotreba kyslíka BSK<sub>5</sub> slúži na nepriame stanovenie organických látok, ktoré podliehajú biochemickému rozkladu pri aeróbných podmienkach. Použili sme štandardizovanú zriedňovaciu metódu pre stanovenie päťdennej BSK<sub>5</sub> pre povrchovú i odpadovú vodu (ČSN 83 0530, časť 11). Vyšetrovali sme homogenizované nekonzervované vzorky.

Stanovenie celkového dusíka podľa Kjeldahla (N- r) je súčtom koncentrácií dusíkatých zlúčenín (NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>) a organických zlúčenín obsiahnutých vo vzorke. Pri analytickom stanovení celkového dusíka sú celkové dusíkaté látky vo vzorke prevedené na amónne ióny a stanovené súhrnne ako amoniakálny

dusík (ČSN 83 0540, časť 13). Na stanovenie sa použila časť vzorky konzervovaná 1 ml kyseliny sírovej na 1 000 ml.

Stanovenie amoniaku a amónnych iónov ( $-N-NH_4$ ) patrí medzi špecifické ukazovatele čistoty povrchových vôd. Pri vypúšťaní odpadových vôd do recipienta patrí obsah amoniakálneho dusíka k záväzným ukazovateľom, obsah amoniaku sa sleduje aj pri kontrole prevádzky a účinnosti biologických čistiarní odpadových vôd. Metóda stanovenia sa zakladá na oddelení amoniaku zo vzorky jednoduchou destiláciou alebo prehánaním s vodnou parou a odmerným stanovením (pri koncentráciách nad 1 mg/l, ČSN 83 0540, časť 10, bod 9a).

Stanovenie dusičnanového dusíka ( $N-NO_3$ ) sa zakladá na redukcii dusičnanov na amoniakálny dusík vodíkom v stave zrodu, ktorý vzniká pri reakcii Devardovej zliatiny s hydroxidom sodným (ČSN 83 0540, časť 11).

Fosfor (P- v) bol stanovený z ortofosforečnanov, ktoré vznikli po oxidačnom rozklade sušiny pomocou kyseliny sírovej a peroxidu vodíka (ČSN 83 0540, časť 14).

U všetkých troch mechanicko-chemicko-biologických ČOV, ktoré spracúvajú tekuté exkrementy ošpaných z veľkochovov, sme vyšetrovali nasledovné frakcie:

- vstup – tekuté exkrementy, ktoré vstupujú do procesu čistenia
- výstup A – vyčistená voda vytekajúca do recipienta
- výstup B – pevná frakcia exkrementov po mechanickom čistení.

## VÝSLEDKY

Z tab. Ia až IIIa a Ib až IIIb vyplýva, že do všetkých troch ČOV vstupuje odpadová voda mikrobiálne a parazitárne kontaminovaná. Prítomnosť hygienicky významných baktérií rodu *Salmonella* sme pri depistážnych vyšetreniach nezistili. V tekutých odpadových vodách sme pravidelne zisťovali prítomnosť vajčiek parazitických červov rodov: *Ascaris*, *Oesophagostomum*, *Trichuris*, *Hymenolepis*. Zaznamenal sa tiež výskyt protozoí rodov *Isospora* a *Eimeria*.

V pevnej frakcii exkrementov (výstup B) po prvom mechanickom prečistení sme zisťovali podobné počty psychrofilných a mezofilných baktérií ako v odpadovej vode pritekajúcej do ČOV. Počty koliformných a fekálne koliformných baktérií v tejto frakcii boli však vyššie. Nezachytili sme baktérie *Salmonella* sp. Počty vajčiek helmintov, resp. oocýst kokcií, boli vo výstupe B v porovnaní so vstupom približne rovnaké.

Vo vyčistenej vode vytekajúcej z ČOV do recipienta (výstup A) sa zisťoval oproti počtom pri vstupe úbytok koliformných a fekálne koliformných baktérií o jeden až dva matematické rady. V počte psychrofilných a mezofilných baktérií pri vstupe a výstupe A bola zaznamenaná redukcia o jeden matematický rad. Vajčka helmintov, resp. oocysty kokcií, sme tu nezachytili.

I. Čistiareň odpadových vôd Košická Polianka – Sewage treatment plant Košická Polianka

a) Mikrobiologické vyšetrenie tekutej a pevnej frakcie odpadových vôd (v 100 ml resp. 10 g) – Microbiological examination of waste water liquid and solid fraction (in 100 ml or 10 g)

	Baktérie <sup>1</sup>				
	psychrofilné <sup>2</sup>	mezofilné <sup>3</sup>	koliformné <sup>4</sup>	fekálne koliformné <sup>5</sup>	salmonely <sup>6</sup>
Vstup	2,2e + 7	7,3e + 6	1,3e + 6	1,1e + 6	0
A Výstup	1,3e + 6	1,3e + 6	6,1e + 4	1,3e + 4	0
B Výstup	1,5e + 7	1,8e + 7	1,7e + 6	5,9e + 5	0

b) Parazitologické vyšetrenie tekutej a pevnej frakcie odpadových vôd (počet v 1 000 ml resp. 100 g) – Parasitological examination of waste water liquid and solid fraction (number in 1 000 ml or 100 g)

	<i>A. suum</i>	<i>Oesophagostomum</i> sp.	<i>Trichuris</i> sp.	<i>Hymenolepis</i> sp.	<i>Isospora</i> sp.	<i>Eimeria</i> sp.
Vstup	28–89	5–19	1–3	0–5	0–9	6–34
A Výstup	0	0	0	0	0	0
B Výstup	12–35	2–6	1–2	0–1	0	2–12

c) Fyzikálno-chemická analýza odpadových vôd a účinnosť ČOV – Physico-chemical analysis of waste waters and sewage treatment plant efficiency

mg/l	pH	BSK <sub>5</sub>	CHSK-Cr	N-v	N-NH <sub>4</sub>	RL	NL
Vstup	7,06	4 370	10 821	1 011,2	728,4	3 500	4 853
A Výstup	8,10	125	976	481,8	476,2	2 012	29,7
B Výstup	–	–	–	–	–	–	–
Účinnosť %	–	97,1	91	52,4	34,6	42,5	99,4

Vstup – Inlet

A Výstup – vyčistená odpadová voda (tekutá frakcia) – Outlet – clean waste water (liquid fraction)

B Výstup – pevná frakcia odpadových vôd po mechanickom čistení – Outlet – solid fraction of mechanically treated waste water

<sup>1</sup>bacteria, <sup>2</sup>psychrophilic, <sup>3</sup>mesophilic, <sup>4</sup>coliform, <sup>5</sup>fecal coliform, <sup>6</sup>salmonellas

## II. Čistiareň odpadových vôd Spišské Vlchy – Sewage treatment plant Spišské Vlchy

a) Mikrobiologické vyšetrenie tekutej a pevnej frakcie odpadových vôd (v 100 ml resp. 10 g) – Microbiological examination of waste water liquid and solid fraction (in 100 ml or 10 g)

	Baktérie <sup>1</sup>				
	psychrofilné <sup>2</sup>	mezofilné <sup>3</sup>	koliformné <sup>4</sup>	fekálne koliformné <sup>5</sup>	salmonely <sup>6</sup>
Vstup	9,9e + 5	9,3e + 4	2,9e + 4	4,3e + 3	0
A Výstup	5,4e + 4	4,9e + 3	2,3e + 3	6,0e + 2	0
B Výstup	–	–	–	–	–

b) Parazitologické vyšetrenie tekutej a pevnej frakcie odpadových vôd (počet v 1 000 ml resp. 100 g) – Parasitological examination of waste water liquid and solid fraction (number in 1 000 ml or 100 g)

	<i>A. suum</i>	<i>Oesophagostomum</i> sp.	<i>Trichuris</i> sp.	<i>Hymenolepis</i> sp.	<i>Isospora</i> sp.	<i>Eimeria</i> sp.
Vstup	1–21	0–3	0–5	0–2	1–3	0–1
A Výstup	0	0	0	0	0	0
B Výstup	–	–	–	–	–	–

c) Fyzikálno-chemická analýza odpadových vôd a účinnosť ČOV – Physico-chemical analysis of waste waters and sewage treatment plant efficiency

mg/l	pH	BSK <sub>5</sub>	CHSK-Cr	N-v	N-NH <sub>4</sub>	RL	NL
Vstup	8,35	61 140	27 782	2 361	1 587	7 797	18 444
A Výstup	7,24	76	1 181	788	741	3 649	221
B Výstup	–	–	–	–	–	–	–
Účinnosť %	–	98,8	96,7	66,6	53,3	53,2	98,8

Vstup – Inlet

A Výstup – vyčistená odpadová voda (tekutá frakcia) – Outlet – clean waste water (liquid fraction)

B Výstup – pevná frakcia odpadových vôd po mechanickom čistení – Outlet – solid fraction of mechanically treated waste water

<sup>1</sup>bacteria, <sup>2</sup>psychrophilic, <sup>3</sup>mesophilic, <sup>4</sup>coliform, <sup>5</sup>fecal coliform, <sup>6</sup>salmonellas

### III. Čistiareň odpadových vôd Veľký Ďur – Sewage treatment plant Veľký Ďur

a) Mikrobiologické vyšetrenie tekutej a pevnej frakcie odpadových vôd (v 100 ml resp. 10 g) – Microbiological examination of waste water liquid and solid fraction (in 100 ml or 10 g)

	Baktérie <sup>1</sup>				
	psychrofilné <sup>2</sup>	mezofilné <sup>3</sup>	koliformné <sup>4</sup>	fekálne koliformné <sup>5</sup>	salmonely <sup>6</sup>
Vstup	3,3e + 7	1,4e + 7	1,5e + 6	1,7e + 6	0
A Výstup	1,3e + 6	1,9e + 6	1,9e + 5	2,4e + 5	0
B Výstup	1,2e + 6	2,7e + 6	1,3e + 7	1,5e + 6	0

b) Parazitologické vyšetrenie tekutej a pevnej frakcie odpadových vôd (počet v 1 000 ml resp. 100 g) – Parasitological examination of waste water liquid and solid fraction (number in 1 000 ml or 100 g)

	<i>A. suum</i>	<i>Oesophagostomum</i> sp.	<i>Trichuris</i> sp.	<i>Hymenolepis</i> sp.	<i>Isospora</i> sp.	<i>Eimeria</i> sp.
Vstup	6–25	0–2	1–3	0–1	0–9	0
A Výstup	0	0	0	0	0	0
B Výstup	5–11	0	1–4	1–2	2–5	0

c) Fyzikálno-chemická analýza odpadových vôd a účinnosť ČOV – Physico-chemical analysis of waste waters and sewage treatment plant efficiency

mg/l	pH	BSK <sub>5</sub>	CHSK-Cr	N-v	N-NH <sub>4</sub>	RL	NL
Vstup	6,82	17 600	62 231	2 613	1 905	11 403	76 390
A Výstup	7,24	76	1 181	788	741	3 649	221
B Výstup	–	–	–	–	–	–	–
Účinnosť %	–	98,35	95,8	92,5	92,7	80,7	97,9

Vstup – Inlet

A Výstup – vyčistená odpadová voda (tekutá frakcia) – Outlet – clean waste water (liquid fraction)

B Výstup – pevná frakcia odpadových vôd po mechanickom čistení – Outlet – solid fraction of mechanically treated waste water

<sup>1</sup>bacteria, <sup>2</sup>psychrophilic, <sup>3</sup>mesophilic, <sup>4</sup>coliform, <sup>5</sup>fecal coliform, <sup>6</sup>salmonellas

Výsledky fyzikálno-chemickej analýzy odpadových vôd vstupujúcich do ČOV (vstup) a vystupujúcich (výstup A) do recipienta poukazujú na stupeň účinnosti čistiaceho procesu. Z tab. Ic až IIIc je vidieť, že na základe hlavných vodohospodárskych ukazovateľov BSK<sub>5</sub> a ChSK-Cr sa účinnosť pri všetkých sledovaných čističkách pohybovala v rozpätí 91–98,35 %. Vysoká čistiaca schopnosť sledovaných technológií sa prejavila i v redukcii NL (97,9–99,4 %).

## DISKUSIA

Vykonané mikrobiologické, parazitologické a fyzikálno-chemické depistážne vyšetrenia mechanicko-chemicko-biologických čistiarní odpadových vôd z fariem ošísaných potvrdili dobrý čistiaci účinok ČOV vo vzťahu k recipientu (výstup A). Vysoká účinnosť čistenia u všetkých troch ČOV sa prejavila poklesom BSK<sub>5</sub> o 97,1–98,8 % a CHSK o 91–96,7 %. Problematickým však ostáva spracovanie, resp. hygienizácie, pevnej frakcie odpadových vôd (výstup B), ktorá vzniká v prvej fáze technologického čistenia po mechanickom prečistení. V pevných odpadoch oproti počtom, ktoré sa nachádzali vo vstupe (surové odpadové vody), sme zisťovali len veľmi nízky úbytok mikróbov. Nachádzali sme v nich aj vitálne propagatívne štádiá (vajička, oocýsty) endoparazitov. Z veterinárno-hygienického hľadiska možno konštatovať, že táto forma pevných odpadov z ČOV je riziková, najmä pri jej voľnej aplikácii v prostredí, napr. vo forme organického hnojiva.

Ako sme uviedli už predtým (J u r i š a i., 1991), čistiace stanice odpadových vôd z veľkochovov ošísaných je nutné doplniť o efektívny systém spracovania a hygienizácie pevných frakcií odpadových vôd, ktoré sú separované v ČOV po mechanickom prečistení pomocou vibračných sieťových separátorov, spádových sít, resp. pásových sieťových lisov. Pevnú frakciu odpadových vôd z veľkochovov ošísaných, ale aj z komunálnych odpadových vôd je najvhodnejšie spracovať kompostovaním, pomocou biotermie prebiehajúcej v termofilnej teplotnej oblasti (J o n á š a P e t ř í k o v á, 1988; P l a c h ý a J u r i š, 1993; N o v á k a i., 1994). Výsledným produktom tohto procesu je kvalitné organické hnojivo s výrazným podielom humínových kyselín. Z hygienického hľadiska je významné i to, že organické hnojivo pripravené kompostovaním, ktoré prebieha v termofilnej teplotnej oblasti, je zbavené väčšiny patogénnych zárodkov (S t r a u c h a i., 1980; J u r i š a i., 1993; N o v á k, 1994).

## Literatúra

- BÍLIKOVÁ, A.: Vplyv veľkokapacitných fariem živočíšnej výroby na kvalitu vôd. Vod. Hospod., řada B, 6, 1988.  
ČSN 83 0531. Mikrobiologický rozbor povrchovej vody. 1983.

- ČSN 83 0540. Chemický a fyzikální rozbor odpadních vod. 1985.
- ČSN 83 0530. Chemický a fyzikální rozbor povrchové vody. 1980.
- ČEREPANOV, A. A.: Instrukcija po laboratornomu kontrolju čistnych sooruzenij na životnovodčeskich kompleksach. Moskva, Kolos 1982.
- HOJOVEC, J.: Hygienické zabezpečení odpadů ze živočišné výroby – součást ochrany životního prostředí. Veterinářství, 38, 1988: 552–554.
- JÍROVEC: Parasitologie pro lékaře. 3. vyd. Praha, Avicenum 1977.
- JONÁŠ, J. – PETŘÍKOVÁ, V.: Využití exkrementů hospodářských zvířat. Praha, Státní zemědělské nakladatelství 1988.
- JURIŠ, P. – BREZA, M. – SCHMIDTOVÁ, D. – VENGLOVSKÝ, J.: Diseminácia a prežívanie zárodkov endoparazitov v životnom prostredí. Veter. Med. (Praha), 36, 1991: 665–671.
- JURIŠ, P. – PLACHÝ, P. – DUBINSKÝ, P. – VENGLOVSKÝ, J. – TÓTH, F.: Vplyv aeróbnej stabilizácie tekutých exkrementov ošpaných v laboratórnych podmienkach na vitalitu *Salmonella typhimurium* a *Ascaris suum*. Vet. Med. – Czech, 38, 1993: 553–558.
- LOEHR, R. C.: Pollution Control for Agriculture. 2nd ed. Academia Press Inc. 1984. 457.
- NOVÁK, P.: Dynamika indikátorových mikroorganizmů v průběhu kompostování zemědělských odpadů. In: Zbor. Konf. Ekológia a veterinárna medicína, Košice, 24.–25. 5. 1994: 69–73.
- NOVÁK, P. – LUKEŠOVÁ, D. – KUBÍČEK, K. – FIŠER, A.: Studium účinnosti čistírny odpadních vod z mikrobiologického a parazitologického hlediska. Zbor. Konf. Ekológia a veterinárna medicína, Košice, 24.–25. 5. 1994: 65–67.
- ONDRAŠOVIČ, M. – MANDELÍKOVÁ, M. – ONDRAŠOVIČOVÁ, O. – PARA, L. – SOKOL, J.: Účinnosť ČOV vo veľkovýkrmni ošpaných v jednotlivých ročných obdobiach. In: Zbor. Konf. Ekológia a veterinárna medicína, Košice, 24.–25. 5. 1994: 113–116.
- PLACHÝ, P. – JURIŠ, P.: Problematika komunálních odpadových vod úrbánnej oblasti Košíc z aspektu helmintologického. Čs. Hyg., 38, 1993: 27–33.
- POKORNÝ, J.: Monitorovací systém životného prostredia územia Slovenskej republiky. In: Zbor. Konf. Ekológia a veterinárna medicína, Košice, 24.–25. 5. 1994: 5–10.
- STRAUCH, D. – BAADER, W. – TIETJEN, C.: Odpady zo živočišnej výroby. Bratislava, Príroda 1980.

Došlo 6. 6. 1994

VENGLOVSKÝ, J. – JURIŠ, P. – SOKOL, J. (Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice; Parasitological Institute of the Slovak Academy of Sciences, Košice; State Veterinary Administration of Slovak Republic, Bratislava):

**Efficacy survey of some sewage treatment plant systems on pig farms in Slovakia.**  
Vet. Med. – Czech, 39, 1994 (11): 677–686.

Bacteriological, helminthological and physico-chemical examinations were carried out to investigate the technological procedure in three water treatment plants treating slurry from large-capacity pig farms (Košická Polianka, Spišské Vlachy, Veľký Ďur). Our investigations were focused on the testing of effectiveness of mechanical, chemical and biological treatment system most frequently used in Slovakia. Our investigations revealed that water-treatment plants, operating on pig farms, fulfil only the

supplies management requirements concerning the treated water, discharged into the recipient. From the hygienic viewpoint further processing or utilization of the solid fraction remains unsolved. This fraction contains considerable concentrations of bacteria and parasitic germs (*Ascaris suum*, *Trichuris suis*, *Isospora* sp., *Eimeria* sp.) most of which exhibit high tenacity in the environment. It is recommended to process this solid fraction by composting before it is applied as a manure. However, the measured values did not exceed the reference hygienic limits. The technological stage of chemical treatment, which follows after the separation and utilizes some coagulants (aluminium sulphate, ferrous sulphate), can increase the chemical load of water stripped of crude organic pollutants, by some undesirable chemical elements.

pig farms; liquid excrements; treatment of waste water; bacteria; helminth eggs; protozoa germs; physico-chemical analysis

---

*Contact Address:*

MVDr. Ján V e n g l o v s k ý , CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovak Republic  
Tel. 095/320 11, fax 095/318 53

---

## VÝVOJ PCR TESTOV NA DETEKCIU BHV-1, BRSV A PESTIVÍRUSOV

Š. Vilček

*Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice  
Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice*

V práci sú zhrnuté výsledky vývoja PCR testov na detekciu BHV-1, BRSV, BVDV a iných pestivírusov. Polymerázová reťazová reakcia s primerami vybranými zo sekvencie gI vírusového génu detekovala 3 fg čistej DNA BHV-1, 0,1–1,0 TCID<sub>50</sub>/ml infekčného materiálu alebo jednu infikovanú bunku. Nebola pozorovaná skřížená reakcia s BHV-2, 3, 4, OHV-1 a OHV-2. Avšak pri amplifikovaní DNA herpesvírusov z vysokej a srnčej zveri ako aj z herpesvírusu kôz bol detekovaný fragment rovnakej dĺžky (468 bp). PCR test detekoval vírus v nosových výteroch experimentálne infikovaných teliat na 1.–14. deň po infekcii. Bola pozorovaná dobrá zhoda medzi PCR a vírusovou izoláciou pri analýze terénnych vzoriek. Detekcia BHV-1 bola úspešná aj v bovinom fetálnom sére a v semene býkov. Bola tiež vyvinutá PCR detekujúca množstvo BVDV, BDV a HCV izolátov. Zo šiestich skúšaných dvojíc primerov vybraných z rôznych častí pestivírusového genómu, najlepšie výsledky poskytovali 324/326 primery pochádzajúce z 5' -nekodujúcej časti genómu. Tieto primery detekovali všetkých 129 izolátov, t.j. 79 boviných, 33 prasačích a 17 ovčích izolátov. Na diferenciaciu pestivírusov bola využitá metóda štiepenia 324/326 amplikónu (288 bp) s *AvaI* a *BglI*. BVDV amplikón bol štiepený s *AvaI*, HCV s *BglI* a *AvaI* a BVDV nebol štiepený ani s jedným enzýmom. Na detekciu BRSV bola vyvinutá nested PCR. Primery boli vybrané s F fúzneho génu. Citlivosť testu bola 0,1 TCID<sub>50</sub>. S výnimkou HRSV nebola pozorovaná skřížená reakcia s heterolognými respiračnými vírusami. Bovinné a ľudské RSV boli diferencované štiepením amplikónu so *ScaI*, ktorá špecificky štiepi len BRSV. PCR test detekoval BRSV v nosových výteroch teliat chovaných v ohnisku BRSV infekcie. *In vitro* amplifikácia detekovala z 35 vzoriek 31 pozitívnych, kým imunofluorescenčný test iba 23 vzoriek.

PCR; *in vitro* amplifikácia; BHV-1; BVDV; pestivírusy; BRSV; diferenciacia

S rozvojom molekulárno-biologického výskumu sa v priebehu 80. rokov vytvorili predpoklady na inováciu laboratórnej diagnostiky infekčných chorôb detekciou infekčných agensov na úrovni genómu. V tomto trende najvýznamnejšie postavenie získali metódy hybridizácie nukleových kyselín a polymerázová reťazová reakcia (PCR). Hybridizačné techniky detekujú genóm agensa pomnožený v infekčnom procese pomocou označenej DNA alebo RNA sondy, kým PCR detekuje agens na základe *in vitro* amplifikácie časti jeho genómu. Zo štúdií zameraných na využitie hybridizačných metód pre laboratórnu diagnostiku infekčných chorôb (Kulski a Norval, 1985; Palva, 1986; Paul, 1990) vyplynulo, že tieto techniky nie sú dostatočne citlivé. Preto sa dnes inovačné trendy v laboratórnej diagnostike infekčných chorôb orientujú na využitie PCR (Mullis a Fallona, 1987; Belák a Ballagi-Pordány, 1993; Vilček, 1992), ktorá dosahuje o niekoľko radov vyšší detekčný limit.

V našom laboratóriu sme sa sústredili na inováciu detekcie vírusov respiračného syndrómu hovädzieho dobytku s využitím metódy dot-blot hybridizácie, PCR a nested PCR. Zo širšieho spektra vírusov sme vybrali boviný herpetický vírus 1 (BHV-1), neskôr vírus slizničnej choroby HD (BVDV) a boviný respiračný syncyciálny vírus (BRSV). V prvej fáze sme overovali možnosť využitia dot-blot hybridizácie s rádioaktívnou a nerádioaktívnou sondou (Vilček a i., 1993a, b), v súčasnej dobe študujeme využitie PCR.

## BHV-1

Infekcia hovädzieho dobytku s BHV-1 sa prejavuje viacerými klinickými príznakmi. Najvýznamnejšia je respiračná forma známa ako infekčná boviná rinotracheitída (IBR) a genitálna forma známa ako infekčná pustulárna vulvovaginitída (IPV). Okrem toho vírus vyvoláva konjunktivitídu, encefalitídu, aborty. Infekcia môže prejsť z akútnej fázy do latentnej formy a vírus sa môže prenášať aj semenom býkov (Kahrs, 1977).

Klasická diagnostika akútnych BHV-1 infekcií je založená na izolácii vírusu na bunkových kultúrach, detekcii protilátok v sére alebo vírusových antigénov imunofluorescenciou, reverznou pasívnou hemaglutináciou, metódou ELISA. Hlavným problémom uvedených metód je nižšia citlivosť v porovnaní so „zlatým štandardom“ – vírusovou izoláciou (Edwards a Gitaó, 1987). Ani metóda hybridizácie nukleových kyselín nespĺnila očakávania zvýšenej citlivosti (Andino a i., 1987; Belák a i., 1988) diagnostických testov.

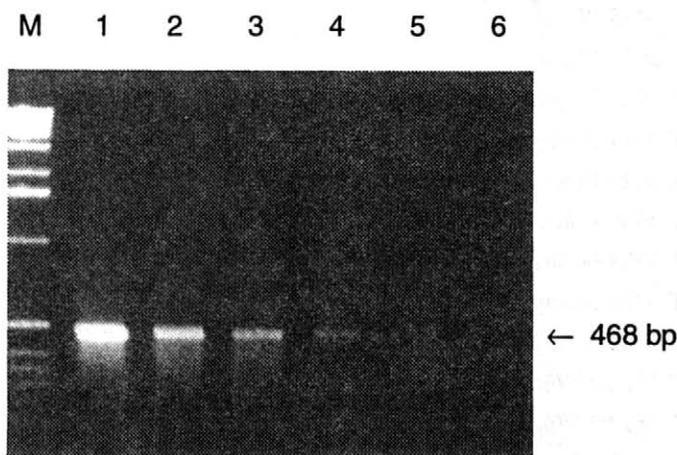
Pri vývoji PCR testu na detekciu BHV-1 narážame na dva väčšie odborné problémy. 137 kb dlhý genóm BHV-1 teoreticky umožňuje vybrať veľa PCR primerov, ale dostupne nukleotidové sekvencie vírusových génov z rôznych kmeňov sú značne limitované. Ďalším problémom je vysoký obsah G/C párov v ge-

nóme BHV-1 (až 72 %), čo spôsobuje značné problémy s úplnou denaturáciou DNA počas PCR testu.

Z limitovaného počtu publikovaných nukleotidových sekvencií sme pre výber primerov zvolili gI gén BHV-1 (W h i t b e c k a i., 1988), ktorý kóduje imunologický dôležitý gI glykoprotein. Vybraté primery ohraničovali 468 bp dlhý fragment DNA. Pred *in vitro* amplifikovaním bol genóm BHV-1 denaturovaný zohriatím na 100 °C/5–7 min s nasledným prudkým tepelným šokom v ľade. Amplifikačná zmes okrem vzorky, primerov, *Taq* DNA polymerázy a dNTP obsahovala aj glycerín. Glycerín o koncentrácii 5–15 % zabezpečoval zvýšenú účinnosť *in vitro* amplifikácie (V i l ě k , 1993a). V jeho neprítomnosti PCR značne varírovala.

Optimalizovaný PCR test je veľmi citlivý. Po 35 cykloch amplifikácie a pri detekcii amplikónu v agarózovom géli s farbením etídiom bromidom test detekuje ešte jednu infikovanú bunku, 3 fg purifikovanej DNA, čo odpovedá asi 20 genómom BHV-1 alebo 1-0,1 TCID<sub>50</sub>/ml (obr. 1) infekčného materiálu (V i l ě k a i., 1994d). Pre porovnanie dot-blot hybridizácia s rádioaktívnou sondou bola schopná detekovať len viac ako 5 000 infikovaných buniek (V i l ě k a i., 1993a).

Nepozorovali sme skříženú reakciu s BHV-2,3,4, OHV-1,2, ale DNA izolovaná z herpesvírusov vysokej (RanHV), srnčej (CerHV) zveri a herpesvírusu kôz



1. Citlivosť PCR testu na detekciu BHV-1. BHV-1 (kmeň 6660) bol desaťnásobne riedený v kultivačnom médiu – Sensitivity of PCR assay for detection of BHV-1. BHV-1 (strain 6660) was 10-fold diluted in the cultivation medium

M – 1 kb marker, 1 – 6 300 TCID<sub>50</sub>/ml, 2 – 630 TCID<sub>50</sub>/ml, 3 – 63 TCID<sub>50</sub>/ml, 4 – 6,3 TCID<sub>50</sub>/ml, 5 – 0,6 TCID<sub>50</sub>/ml, 6 – 0,06 TCID<sub>50</sub>/ml

(CapHV) vykazovala pozitívnu reakciu. Na rozlíšenie pôvodu amplikónu od jednotlivých herpesvírusov sme využili jeho štiepenie s restriktívnymi endonukleázami *AvaI*, *SmaI*; *DdeI*, *BglI* pričom vznikali rôzne dlhé restriktčné fragmenty (L y a k u a i., 1994).

PCR test bol ďalej overovaný pri detekcii BHV-1 v nosových výteroch experimentálne infikovaných teliat. Opäť sa potvrdila vysoká citlivosť molekulárno-genetického testu, lebo PCR detekovala prítomnosť vírusu na 1.–14. deň po infekcii podobne ako vírusová izolácia (V i l č e k a i., 1994d). V rovnakom materiáli metóda dot-blot hybridizácie detekovala vírus len na 1.–6. deň (V i l č e k a i., 1993b).

Aj pri analýze terénnych vzoriek metódou PCR a vírusovou izoláciou bola zistená dobrá zhoda medzi oboma testami detekcie BHV-1. Z 27 analyzovaných vzoriek (nosové výtery, tkanivové homogenáty, pľúca a lymfatické uzliny) odobraných z hovädzieho dobytko zo 16 ohnísk IBR, 13 z nich boli pozitívnych vírusovou izoláciou a 18 – PCR testom. Všetky vzorky pozitívne biologickou metódou boli pozitívne aj metódou *in vitro* amplifikácie (tab. I). Avšak DNA

I. Porovnanie PCR testu a metódy izolácie vírusu (VI) pri detekcii BHV-1 v terénnych vzorkách – Comparison of PCR assay and virus isolation (VI) for detection of BHV-1 in field samples

Vzorka <sup>1</sup>	PCR <sup>2</sup>	VI <sup>3</sup>
T 3445 Pľúca <sup>2</sup>	+	+
T 3621 Pľúca	-	-
T 3621/2 Lymfatické uzliny <sup>3</sup>	-	-
T 3544 Nosný výter <sup>4</sup>	+	+
T 3623 Pľúca	-	-
T 3669 Pľúca	+	+
T 3385 Nosný výter	+	+
T 3325 Nosný výter	+	+
T 3380 Nosný výter	+	+
T 3622/2 Pľúca	+ <sup>a</sup>	-
T 3622/3 Pľúca	+ <sup>a</sup>	-
T 3622/4 Lymfatické uzliny	+ <sup>a</sup>	-

a = veľmi slabý elektroforetický pás – very weak electrophoretic band

Najvyššia intenzita elektroforetických pásov bola pozorovaná s DNA izolovanou s nosových výterov – The most intensive electrophoretic bands were observed with DNA isolated from nasal swabs

<sup>1</sup>sample, <sup>2</sup>lung, <sup>3</sup>lymphatic glands, <sup>4</sup>nasal swab

izolovaná z niektorých tkanivových homogenátov musela byť 50–100krát riedená, aby mohla byť úspešne amplifikovaná s PCR (V i l ě k a i., 1994c).

Nedávno boli publikované údaje o vývoji PCR testov na detekciu BHV-1 v semene býkov (V a n e n g e l e n b u r g a i., 1993; W i e d m a n n a i., 1993).

Naše predbežné pokusy na modelových experimentoch naznačili, že PCR detekuje BHV-1 aj v semene býkov s citlivosťou do 600 TCID<sub>50</sub>/ml. Pri detekcii vírusu vo fetálnom bovinnom sére využívanom na kultiváciu buniek, citlivosť bola desaťnásobne vyššia – 60 TCID<sub>50</sub>/ml (V i l ě k a i., 1994d).

## BVDV A INÉ PESTIVÍRUSY

Do skupiny pestivírusov patrí vírus slizničnej choroby (BVDV), ktorý u hovädzieho dobytku vyvoláva respiračné a hnačkové ochorenie, malformácie a aborty plodov, vírus klasického moru prasiat (HCV) a border disease virus (BDV) infikujúci ovce. Všetky pestivírusy sú antigenne veľmi príbuzné a vyvolávajú aj medzidruhovú infekciu zvierat, čo sťažuje ich dôkaz a diferenciáciu. Existencia cytopatogénnych a necytopatogénnych kmeňov BVDV a BDV je ďalším diagnostickým problémom. BVDV sa prenáša aj spermiami býkov a tiež kontaminuje séra na kultiváciu buniek.

Súčasná laboratórna diagnostika pestivírusových infekcií je založená na izolácii vírusu na bunkových kultúrach, detekcii vírusových antigénov imunologickými technikami alebo imunochemicky, detekciou špecifických protilátok vírus-neutralizačným testom (D u b o v i , 1990). Tieto metódy sú časovo zdĺhavé a niektoré z nich nie sú príliš špecifické. Hybridizačné techniky tiež nie sú dostatočne citlivé a špecifické.

Najväčším problémom pri vývoji PCR testu na detekciu pestivírusov je veľmi vysoká variabilita ich genómov (R i d p a t h a B o l i n , 1991). Chýba tiež dostatok publikovaných sekvencií rôznych kmeňov BVDV a HCV a sekvencie genómu BDV vôbec nie sú k dispozícii.

Po metodickom zvládnutí metódy RT-PCR (V i l ě k , 1993b) sme pristúpili k vyhľadaniu univerzálnych primerov na detekciu všetkých pestivírusov. Pri ich výbere sme zvolili prístup, v ktorom počítačom navrhnuté sekvencie primerov a niektoré publikované primery z rôznych častí 12,5 kb pestivírusového genómu boli experimentálne odskúšané pri detekcii veľkého počtu vírusových izolátov. Žiaľ, informácie vložené do počítača pre výber primerov boli značne obmedzené. Veď doteraz boli úplne sekvenované iba genómy troch kmeňov BVDV (NADL, Osloss, SD-1) a dvoch kmeňov HCV (Alford, Brescia). Pri vysokej diverzite pestivírusových genómov výber univerzálnych primerov bol veľmi problematický.

V štúdiu sme vyšetrovali šesť párov primerov. Dva páry primerov 324/326 a 325/326 amplifikujúce 288 bp resp. 299 bp DNA fragmenty vybraté zo silne

konzervatívnych častí 5'-nekodujúcej oblasti genómov. Primery H<sub>1</sub>/H<sub>2</sub> pochádzali z génu kodujúceho p80 pričom ohraničovali 452 bp úsek a boli publikované Hooft van Iddekinge a i. (1992). Primery 928/929 vymedzovali 944 bp úsek v gene p54 a boli schopné zachytiť inzercie v kmeňoch NADL a Osloss. Ďalšie primery L<sub>1</sub>/L<sub>2</sub> boli navrhnuté Lopezom a i. (1991) z 3'-oblasti BVDV genómu (205 bp). Z rovnakej oblasti pochádzali aj naše S1/S2 primery amplifikujúce 449 bp DNA fragment.

*In vitro* amplifikácia 129 pestivírusových kmeňov a izolátov metódou RT-PCR odkryla kvalitu navrhnutých primerov. Dve dvojice primerov, 324/326 a 325/326, zachytili všetkých 79 analyzovaných bovinných izolátov (tab. II). Primery 324/326 na rozdiel od ostatných zachytili tiež všetkých 33 prasačích izolátov a 17 študovaných ovčích izolátov (Vilček a i., 1994b).

## II. Detekcia 129 pestivírusov izolovaných z kráv, prasiat a oviec metódou RT-PCR – Detection of 129 pestiviruses originating from cattle, pigs and sheep by RT-PCR

Pôvod pestivírusov (počet) <sup>1</sup>	Primery <sup>5</sup>					
	324/326	325/326	S <sub>1</sub> /S <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> /H <sub>2</sub>	928/929	L <sub>1</sub> /L <sub>2</sub>
Hovädzí dobytok <sup>2</sup> (79)	79	79	75	72	48	57
Prasatá <sup>3</sup> (33)	33	31	32	ND	0	ND
Ovce (17)	17	7	8	4	3	ND

ND = nezistené – not determined

<sup>1</sup>origin of pestiviruses (counts), <sup>2</sup>cattle, <sup>3</sup>pigs, <sup>4</sup>sheep, <sup>5</sup>primers

Primery 324/326 dopĺňajú škálu univerzálnych pestivírusových primerov (Ridpath a i., 1993; Wirza a i., 1993). Ich univerzálnosť si vysvetľujeme tým, že pochádzajú z 5'-konca genómu, ktorý môže obsahovať regulačné oblasti pre replikáciu pestivírusov. Vzhľadom na ich biologickú dôležitosť sú tieto sekvencie silne evolučne konzervované.

Pri metóde RT-PCR sa využívajú dva enzýmy: reverzná transkriptáza na prepis RNA genómu do cDNA a *Taq* DNA polymeráza na *in vitro* amplifikáciu cDNA metódou PCR. Nový enzým, *Tth* DNA polymeráza, obsahuje obe enzymové aktivity (Meyers a Gelfand, 1991). V snahe zjednodušiť detekciu pestivírusov sme overovali nedávno vyvinutú metódu s využitím *Tth* DNA polymerázy v ktorej reverzná transkripcia a PCR využíva stejný reakčný roztok (Young a i., 1993). Žiaľ, v týchto experimentoch *Tth* DNA polymeráza sa kvalitou nevyrovnala *Taq* DNA polymeráze (Vilček a i., 1994b). Ani s univerzálnymi 324/326 primerami *Tth* DNA polymeráza nebola schopná amplifiko-

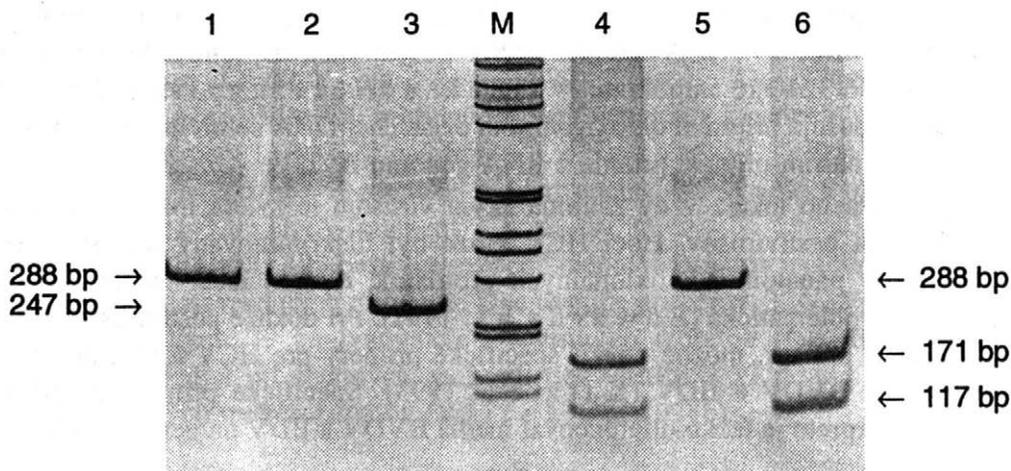
vať viaceré pozitívne vzorky BVDV a BDV detekované *Taq* DNA polymerázou (E a s t o n a i., 1994). Avšak *Tth* DNA polymeráza úspešne inkorporovala Dig-dUTP do 324/326 amplikónu (V i l č e k a H e r r i n g, 1994). Táto metóda zjednodušuje prípravu digoxigenínom označenej DNA sondy priamo z RNA templátu, v našom prípade priamo z RNA genómu BVDV.

Veterinárneho lekára vždy zaujíma akým vírusom je zviera infikované, t. j. diferenciácia pestivírusov. Hoci HCV môže byť diskriminovaný od ostatných pestivírusov panelom monoklonálnych protilátok, diferenciácia medzi BVDV a BDV je problematická (E d w a r d s a i., 1991). Pri dôkaze pestivírusov s využitím PCR je napr. možné použiť špecifické primery pre HCV a tým ho diferencovať od BVDV a BDV (K a t z a i., 1993). Špecifické primery na BDV neexistujú a preto je ťažko diferencovať medzi BVDV a BDV na genetickej úrovni.

Naša stratégia diferenciácie pestivírusov bola založená na štiepení DNA fragmentu (amplikónu) získaného RT-PCR s univerzálnymi pestivírusovými 324/326 primerami s využitím restričných endonukleáz. Výber enzýmov opäť naznačila počítačová analýza. Amplikón 324/326 obsahoval množstvo rozpoznávacích miest pre restričné endonukleázy. Z piatich porovnaných sekvencií BVDV a HCV podľa počítačovej analýzy *AvaI* teoreticky štiepila 288 bp amplikón u BVDV a HCV kmeňov na 117 bp a 171 bp fragmenty, *BglI* len u HCV kmeňov na 41 bp 247 bp fragmenty. Či tieto restričné miesta sú zachované u ostatných kmeňov BVDV a HCV a čo vznikne v prípade BDV izolátov mohla potvrdiť iba experimentálna analýza.

Experimenty úplne potvrdili teoretické predpoklady. Restričná endonukleáza *AvaI* štiepila amplikóny všetkých študovaných BVDV a HCV izolátov, kým *BglI* len HCV izoláty v zhode s počítačovou analýzou. Tým je možné diferencovať medzi BVDV a HCV. Časť ovčích izolátov sa chovala podobne ako BVDV, t. j. boli štiepené len s *AvaI*. Druhá časť ovčích izolátov, ktorá podľa analýzy so špecifickými monoklonálnymi protilátkami sa chovala podobne ako Moredun referenčný kmeň pre BDV, nebola štiepená ani jedným enzýmom (obr. 2). Tým sme dosiahli diferenciáciu medzi BVDV a BDV (V i l č e k a i., 1994b). Teda BVDV amplikóny sú štiepené len s *AvaI*, HCV s *AvaI* a *BglI* a BDV nie sú vôbec štiepené. Nezávisle od týchto experimentov rovnaké výsledky diferenciácie boli získané aj s využitím panelu špecifických monoklonálnych protilátok a sekvenčnou analýzou E2 génu.

Životaschopnosť metodicky jednoduchého spôsobu diferenciácie pestivírusov sme overili aj v iných experimentoch. Pri analýze bovinných a ovčích izolátov získaných z viacerých fariem vo Švédsku vznikla otázka, ktoré izoláty sú BVDV alebo BDV. Naša metóda rovnako ako aj metóda s využitím monoklonálnych protilátok a konštrukcia fytogenetických vzťahov na genetickej úrovni spoločne



## 2. Diferenciácia pestivírusov s využitím RT-PCR a štiepením 324/326 amplikónu s *AvaI* a *BglI* – Differentiation of pestiviruses using RT-PCR and the cleavage of the 324/326 amplicon by *AvaI* and *BglI*

1–3 amplikóny štiepené s *BglI*; 4–6 amplikóny štiepené s *AvaI* — 1–3 amplicons cleaved by *BglI*; 4–6 amplicons cleaved by *AvaI*

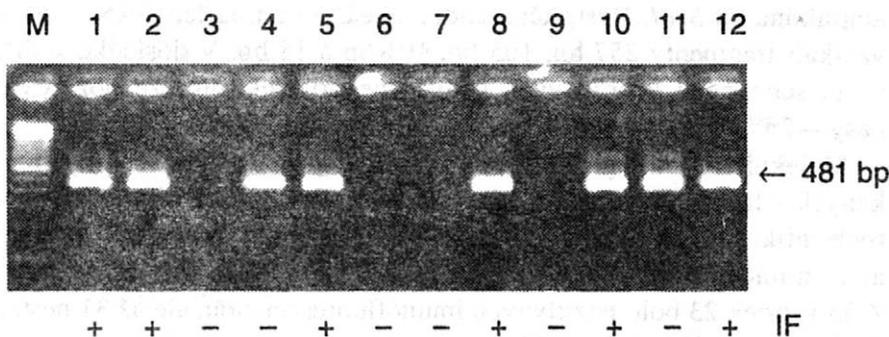
1,6 – bovinné izoláty (79 ks) a ovčie izoláty – referenčný kmeň Weybridge (11 ks); 2,5 – ovčie izoláty – referenčný kmeň Moredun (6 ks) a jeden prasačí izolát – (UK 87/6); 3,4 – prasačie izoláty (32 ks) — 1,6 – bovine isolates (79 samples) and sheep isolates – reference strain Weybridge (11 samples); 2,5 – sheep isolates – reference strain Moredun (6 samples) and one pig isolate (UK 87/6); 3,4 – pigs isolates (32 samples)

indikovali, že zvieratá boli infikované len BVDV (P a t o n a i., 1994). Analýza HCV izolátov získaných z rôznych ohnísk nákazy prasiat vírusom klasického moru ošípaných tiež potvrdila, že vyvinutý test diferencie pestivírusov sa osvedčil aj s izolátmi zo Slovenska (V i l č e k , T a k á c s o v á , S t r o j n ý , M o j ž i š , nepublikované výsledky).

## BRSV

Bovinný respiračný syncyciálny vírus (BRSV) spôsobuje akútne respiračné ochorenia hovädzieho dobytku. Infekcia sa prejavuje horúčkou, malátnosťou, problémami dýchacích ciest, znížením mliečnej úžitkovosti. Ohniská nákazy vznikajú na celom svete (S h a r m a a W o l d e h i w e t , 1991).

Doterajšie metódy detekcie BRSV sú založené na detekcii vírusových antigénov imunofluorescenciou (T h o m a s a S t o t t , 1981) a ELISA (F e r n a n -



### 3. Detekcia BRSV s nested PCR a imunofluorescenciou – Detection of BRSV by nested PCR and immunofluorescence

1–12 amplifikovaná DNA z nosových výterov býkov z farmy s výskytom BRSV infekcie – 1–12 amplified DNA isolated from nasal swabs of bulls housed in farm with the occurrence of BRSV infectious

IF – paralelná detekcia vírus špecifického antigénu imunofluorescenciou – IF – detection of the virus specific antigen by immunofluorescence

d o a i., 1989). Žiaľ, tieto metódy nie sú citlivé a špecifické. Klasická izolácia vírusu na bunkových kultúrach zlyháva, lebo vírus je veľmi nestabilný (S m i t h a i., 1975).

Napriek tomu, že RT-PCR test na detekciu BRSV už bol vyvinutý (O b e r s t , 1993a, b), chýbajú údaje o analýze terénnych vzoriek a porovnanie s klasickými diagnostickými technikami. Naším cieľom bol vývoj veľmi citlivého nested RT-PCR testu na detekciu BRSV, ktorý nahradí problematickú vírusovú izoláciu. Kvalita testu mala byť overená pri analýze vzoriek získaných z infikovaných chovov.

Pre výber primerov sme zvolili gén kodujúci fúzny F proteín (W a l r a v e n s a i., 1990). Pomocou programu OLIGO sme vybrali štyri primery pre nested PCR, ktoré pochádzali z konzervovaných oblastí F génu. Vonkajšie primery ohraničovali fragment 711 bp, vnútorne 481 bp. Teoreticky naše primery mohli detekovať bovinne izoláty BRSV, ale aj niektoré izoláty ľudského RSV (HRSV).

Výsledkom nested RT-PCR testu bol elektroforetický pas o veľkosti 481 bp silnej intenzity. Citlivosť testu dosiahla limit 0,1 TCID<sub>50</sub>. Nepozorovali sme skříženú reakciu s vírusom parainfluenzy-3, Sendai vírusom, BVDV, bovinným koronavírusom, bovinným adenovírusom sérotyp 2, BHV-1 a BHV-4. U niektorých izolátov HRSV sme však v zhode s počítačovou analýzou zaregistrovali pozitívnu reakciu detekciou 481 bp fragmentu. Na diferenciaciu medzi BRSV a HRSV sme využili oligonukleotidovú sondu označenú biotínom alebo štiepenie 481 bp

amplikónu so *Scal*. Restriktčná endonukleáza štiepila len BRSV vzorky pričom vznikali fragmenty 257 bp, 105 bp, 101 bp a 18 bp. V dôsledku slabšej rozlišovacej schopnosti agarózových gélov sme pri elektroforéze pozorovali len dva pasy – 257 bp a okolo 100 bp (V i l č e k a i., 1994a).

Molekulárno-biologický test sa osvedčil aj pri analýze terénnych vzoriek získaných z fariem s výskytom BRSV infekcie pri dôkaze vírusu v nosových výte- roch infikovaných býkov. Nested RT-PCR detekovala viac pozitívnych vzoriek ako imunofluorescenčná technika dôkazu vírusových antigénov (obr. 3). Z 35 vzoriek 23 bolo pozitívnych imunofluorescenciou, ale až 31 nested RT-PCR testom (V i l č e k a i., 1994a).

## ZÁVER

Detekcia BHV-1 s využitím PCR patrí medzi prvé pokusy dokázať tento vírus metódami *in vitro* amplifikácie DNA. Citlivosť a špecifickosť testu sú vlastnosti, ktoré ho predurčujú ako alternatívu k biologickej izolácii vírusu. Test môže byť využitý nie len na diagnostiku akútnej formy IBR, ale jeho vysoká citlivosť naznačuje využitie aj pri diagnostike latentnej formy infekcie a pri detekcii vírusu v semene býkov a v sérach na kultiváciu buniek.

Univerzálne 324/326 primery na detekciu pestivírusov doplnili škálu dvoch univerzálnych pestivírusových primerov publikovaných v odbornom písomníctve. Jednoduchý spôsob diferenciacie medzi BVDV, BDV a HCV s využitím štiepenia amplikónu s *Aval* a *BglI* patrí medzi originálne prístupy v medzinárodnom kontexte. Metóda diferenciacie sa využije nie len pre laboratórnu diagnostiku pestivírusových infekcií, ale prispeje aj do mozaiky poznatkov o pestivírusoch.

Vývoj nested RT-PCR testu na detekciu BRSV tiež nebol doteraz popísaný. Analýza terénnych vzoriek z infikovaných chovov je ďalšou prioritou našich štúdií. Test môže zohrať dôležitú úlohu pri štúdiu patogenézy BRSV.

## Literatúra

- ANDINO, R. H. – TORRES, H. N. – POLACINO, P. S. – SCHUDEL, A. A. – PALMA, E. L.: Detection of bovine herpesvirus-1 nucleic acid sequence, using a dot-blot hybridization procedure. *Amer. J. Vet. Res.*, 48, 1987: 984–987.
- BELÁK, S. – BALLAGI-PORDÁNY, A.: Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet. Res. Commun.*, 17, 1993: 55–72.
- BELÁK, S. – LINNET, T. – MAGYAR, G. – HARRACH, B. – BENKO, M. – KLINGE-BORN, B. – KLINTEVAL, K. – BARTHA, A.: Bovine herpesvirus 1: rapid diagnosis of infection by direct filter hybridization. *Mol. Cell. Probes*, 2, 1988: 147–156.
- DUBOVI, E. J.: The diagnosis of bovine viral diarrhea infections: A laboratory view. *Vet. Med.*, Oct., 85, 1990: 1133–1139.

- EASTON, L. A. – VILČEK, Š. – NETTLETON, P. F.: Evaluation of a „one tube“ reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of ruminant pestiviruses. *J. Virol. Meth.*, 1994 (v tlači).
- EDWARDS, S. – GITAO, G. C.: Highly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: amplified ELISA and reverse passive haemagglutination. *Vet. Microbiol.*, 13, 1987: 135–141.
- EDWARDS, S. – MOENNIG, V. – WENSVOORT, G.: The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Vet. Microbiol.*, 29, 1991: 101–108.
- FERNANDO, A. O. – ANDERSON, G. A. – SANDERS, J. – GROTELVESCHEN, D.: Detection of bovine respiratory syncytial virus using a heterologous antigen-capture enzyme immunoassay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1, 1989: 210–214.
- HOOFT van IDEKINGE, B. J. L. – Van WAMEL, J. L. B. – Van GENNIP, H. G. P. – MOORMAN, R. J. M.: Application of the polymerase chain reaction to the detection of bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet. Microbiol.*, 30, 1992: 21–34.
- KAHRS, R. F.: Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 171, 1977: 1055–1064.
- KATZ, J. B. – RIDPATH, J. F. – BOLIN, S. R.: Presumptive diagnostic differentiation of hog cholera virus from bovine viral diarrhoea and border disease virus by using a cDNA nested-amplification approach. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1993: 565–568.
- KULSKI, J. K. – NORVAL, M.: Nucleic acid probes in diagnosis of viral diseases of man. Brief review. *Arch. Virol.*, 83, 1985: 3–15.
- LOPEZ, O. J. – OSORIO, F. A. – DONIS, R. O.: Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 1991: 578–582.
- LYAKU, J. R. S. – VILČEK, Š. – NETTLETON, P. F. – MARSDEN, H.: The use of PCR and restriction endonuclease analysis to distinguish alpha herpesviruses isolated from cattle, goat, red deer and reindeer. 1994 (připravené do tlače).
- MULLIS, K. B. – FALOONA, F. A.: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 155, 1987: 335–350.
- MYERS, T. W. – GELFAND, D. H.: Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 30, 1991: 7661–7666.
- OBERST, R. D. – HAYS, M. P. – EVERMANN, J. F. – KELLING, C. L.: Characteristic differences in reverse transcription-polymerase chain reaction products of ovine, bovine and human respiratory syncytial viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5, 1993a: 322–328.
- OBERST, R. D. – HAYS, M. P. – HENNESSY, K. J. – STINE, L. C. – EVERMANN, J. F. – KELLING, C. L.: Identifying bovine respiratory syncytial virus by reverse transcription-polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridizations. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1993b: 1237–1240.
- PALVA, A.: Microbial diagnostics by nucleic acid hybridization. *Ann. Clin. Res.*, 18, 1986: 327–336.
- PATON, D. J. – CARLSSON, U. – LOWINGS, J. P. – SANDS, J. J. – VILČEK, Š. – ALENIUS, S.: Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Vet. Microbiol.*, 1994 (v tlači).

- PAUL, P. S.: Application of nucleic acid probes in veterinary infectious diseases. *Vet. Microbiol.*, 24, 1990: 409–417.
- RIDPATH, J. F. – BOLIN, S. R.: Hybridization analysis of genomic variability among isolates of bovine viral diarrhoea virus using cDNA probes. *Mol. Cell. Probes*, 5, 1991: 291–298.
- RIDPATH, J. F. – BOLIN, S. R. – KATZ, J.: Comparison of nucleic acid hybridization and nucleic acid amplification using conserved sequences from the 5' noncoding region for detection of bovine viral diarrhoea virus. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1993: 986–989.
- SHARMA, R. – WOLDEHIWET, Z.: Bovine syncytial virus: a review. *Vet. Bull.*, 61, 1991: 1117–1131.
- SMITH, M. H. – FREY, M. L. – DIERKS, R. E.: Isolation, characterization and pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.*, 47, 1975: 237–247.
- THOMAS, L. H. – STOTT, E. J.: Diagnosis of respiratory syncytial virus infection in the bovine respiratory tract by immunofluorescence. *Vet. Rec.*, 108, 1981: 432–435.
- VANENGELENBURG, F. A. C. – MAES, R. K. – VANOIRSCHOT, J. T. – RIJSEWIJK, F. A. M.: Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type-1 in bovine semen. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1993: 3129–3135.
- VILČEK, Š.: PCR – metóda *in vitro* amplifikácie DNA. *Biologické listy*, 57, 1992: 28–44.
- VILČEK, Š.: Detection of the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR. *J. Virol. Meth.*, 41, 1993a: 245–248.
- VILČEK, Š.: *In vitro* amplifikácia fragmentu genómu vírusu slizničnej choroby (BVD-MD) PCR metódou. *Vet. Med.–Czech.*, 38, 1993b: 257–266.
- VILČEK, Š. – DELIOVÁ, I. – FORGÁČ, O. – STROJNÝ, L. – TAKÁCSOVÁ, I. – HARVAN, M. – BENKO, G.: Detection of bovine herpesvirus 1 with various types of DNA probes. *Acta Vet. Hung.*, 41, 1993a: 179–190.
- VILČEK, Š. – DELIOVÁ, I. – STROJNÝ, L. – FORGÁČ, O. – HARVAN, M.: The effect of the mode of sampling on BHV-1 detection in infected cattle by dot-blot hybridization. *Vet. Microbiol.*, 36, 1993b: 355–358.
- VILČEK, Š. – HERRING, A.: A single tube method for the preparation of digoxigenin-labelled probe from RNA by PCR. *Biotechniques*, 16, 1994: 1020.
- VILČEK, Š. – ELVANDER, M. – BALLAGI-PORDÁNY, A. – BELÁK, S.: Development and application of the nested polymerase chain reaction (PCR) for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 1994a: 2225.
- VILČEK, Š. – HERRING, A. J. – HERRING, J. A. – NETTLETON, P. F. – LOWINGS, J. P. – PATON, D.: Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.*, 1994b (v tlači).
- VILČEK, Š. – NETTLETON, P. F. – HERRING, A. J.: Detection of bovine herpesvirus 1 in clinical samples by the polymerase chain reaction. 1994c (pripravené do tlače).
- VILČEK, Š. – NETTLETON, P. F. – HERRING, J. A. – HERRING, A. J.: Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, 1994d (v tlači).

WALRAVENS, K. – KETTMANN, R. – COLLARD, A. – COPPE, P. – BURNY, A.: Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.*, 71, 1990: 3009–3014.

WHITBECK, J. C. – BELLO, L. J. – LAWRENCE, W. C.: Comparison of the bovine herpesvirus 1 gI gene and the herpes simplex virus type 1 gB gene. *J. Virol.*, 62, 1988: 3319–3327.

WIEDMANN, M. – BRANDON, R. – WAGNER, P. – DUBOVI, E. J. – BATT, C. A.: Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *J. Virol. Meth.*, 44, 1993: 129–139.

WIRZ, B. – TRATSHIN, J. D. – MÜLLER, H. K. – MITCHELL, D. B.: Detection of hog cholera virus and differentiation from other pestiviruses by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1993: 1148–1154.

YOUNG, K. K. Y. – RESNICK, R. M. – MYERS, T. W.: Detection of hepatitis c virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1993: 882–886.

Došlo 15. 7. 1994

VILČEK, Š. (University of Veterinary Medicine and Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovakia):

#### **Development of PCR assays for detection of BHV-1, BRSV and pestiviruses.**

*Vet. Med. – Czech*, 39, 1994 (11): 687–700.

The development of PCR assays for detection of BHV-1, BRSV, BVDV and another pestiviruses is summarized.

A polymerase chain reaction assay based on primers selected from the viral gI glycoprotein gene detected 3 fg pure BHV-1 DNA, 0.1–1.0 TCID<sub>50</sub> or a single infected cell. No amplification was observed with DNA from BHV-2, BHV-3, BHV-4, OHV-1 or OHV-2. However, a fragment of the correct size (468 bp) was amplified using DNA from herpesviruses isolated from reindeer, red deer and goat. The PCR assay was able to detect virus in nasal swabs 1–14 days after experimental infection of cattle and there was a good correlation when PCR was compared to virus isolation for the detection of BHV-1 in clinical field samples. Detection of BHV-1 in fetal bovine serum and semen samples was also successful.

PCR detecting a broad range of BVDV, BDV and HCV was developed. Of six sets of primers selected from different parts of the pestivirus genome the best results were provided by a pair 324/326 from the highly conserved 5'-non-coding region which gave an amplification with all 129 isolates tested. This panel consisted of 79 isolates from cattle, 33 from pigs and 17 from sheep. Differentiation between viruses was achieved by cleavage of the PCR-amplified products (288 bp) with the restriction endonucleases *AvaI* and *BglII*. The BVDV products were cleaved by *AvaI*, HCV by *BglII* and *AvaI*. Both enzymes, *AvaI* and *BglII*, did not cut the BDV products.

A nested polymerase chain reaction assay was developed for the detection of bovine respiratory syncytial virus (BRSV). Primers were selected from the gene encoding the F fusion protein. The sensitivity of PCR assay was 0.1 TCID<sub>50</sub>. No cross reaction was observed with nine heterologous respiratory viruses. PCR products of bovine and human RSV strains were discriminated using endonuclease *ScaI*, which specifically cleaved products of BRSV. PCR assay detected BRSV in nasal swabs collected from cattle in the acute stage of respiratory disease. *In vitro* amplification detected 31 positive samples of 35 while immunofluorescence only 23 samples.

PCR; *in vitro* amplification; BHV-1; BVDV; pestiviruses; BRSV; differentiation

---

*Contact Address:*

Ing. Štefan V i l ě k , CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva,  
Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republic  
Tel. 095/321 11, fax 095/76 76 75

---

# KOLONIZÁCIA TRÁVIACEHO TRAKTU GNTOBIOTICKÝCH A KONVENČNÝCH JAHNIAT DEFINOVANOU LAKTOFLÓROU

A. Bomba<sup>1</sup>, I. Kravjanský<sup>1</sup>, R. Kaštel<sup>2</sup>, M. Čížek<sup>2</sup>, B. Kapitančík<sup>2</sup>,  
Z. Juhásová<sup>1</sup>, R. Herich<sup>1</sup>, R. Žitňan<sup>3</sup>, V. Bučko<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice

<sup>2</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

<sup>3</sup>Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra, pracovisko Košice

<sup>4</sup>Experimentálne výskumné stredisko Univerzity veterinárskeho lekárstva  
v Košiciach so sídlom v Zemplínskej Teplici

Bol sledovaný vplyv inokulácie *Lactobacillus casei* 294/89 na kolonizáciu črevného traktu a vybrané ukazovatele metabolického profilu gnotobiotických a konvenčných jahniat z hľadiska jeho možného využitia v prevencii diarrhoického syndrómu mláďat bakteriálnej etiológie. Populácia *L. casei* kolonizujúca črevný epitel dosahovala vo vekovej dynamike v priemere vyšších hodnôt u gnotobiotických jahniat v porovnaní s laktobacilami u konvenčných jahniat so významným rozdielom ( $p < 0,001$ ) vo veku tri dni a v priemere boli počty adherovaných laktobacilov u gnotobiotov významne vyššie v jejúne a kólone ( $p < 0,05$ ). V dolných úsekoch tráviaceho traktu boli na črevnom epiteli zistené najvyššie počty laktobacilov u oboch skupín. Aj počty *L. casei* v črevnom obsahu gnotobiotov boli vo vekovej dynamike v priemere vyššie ako počty laktobacilov u konvenčných jahniat, ale rozdiely neboli významné. Z hľadiska jednotlivých úsekov čreva bola populácia *L. casei* u gnotobiotov významne vyššia ( $p < 0,01$ ) v jejúne. Najvyššie počty laktobacilov v obsahu boli u gnotobiotov v kólone ( $6,17 \log 10/\text{cm}^2$ ), u konvenčných jahniat v jejúne ( $4,71 \log 10/\text{cm}^2$ ). Koncentrácia kyseliny mliečnej v obsahu jejúna dosahovala vyšších hodnôt u konvenčných jahniat vo veku tri a šesť dní a u gnotobiotov kulminovala vo veku tri týždne ( $13,19 \text{ mmol/l}$ ). U konvenčných jahniat boli zaznamenané významne vyššie hladiny celkových bielkovín v sére vo veku tri ( $p < 0,05$ ) a šesť dní ( $p < 0,01$ ) a celkových sérových imunoglobulínov vo veku tri dni ( $p < 0,01$ ). U gnotobiotických jahniat bola koncentrácia kyseliny octovej v sére významne vyššia vo veku tri ( $p < 0,05$ ) a šesť dní ( $p < 0,01$ ) a u tejto skupiny zvierat došlo vo vekovom intervale 10–15 dní k dvojnásobnému vzostupu koncentrácie kyseliny mliečnej v sére so súčasným poklesom koncentrácie kyseliny octovej na jednu štvrtinu.

jahňatá; gnotobiot; *Lactobacillus casei*; kolonizácia; tráviaci trakt

Laktobacily sú súčasťou prirodzenej črevnej a slizničnej mikroflóry. Tráviaci trakt osídľujú už v prvých hodinách života. Pre svoje priaznivé biologické účinky nachádzajú široké uplatnenie. Využívajú sa v potravinárskom priemysle, ale aj v poľnohospodárstve pri konzervovaní objemových krmív. Veľmi významnú úlohu má využitie laktobacilov formou probiotík. Aplikácia probiotík sa v živočíšnej výrobe a vo veterinárnej medicíne uplatňuje pri zlepšovaní konverzie živín krmiva a zvyšovaní hmotnostných prírastkov (Burgstaller a i., 1984; Svozil a i., 1987; Skřivanová a Macháňová, 1990; Wallace a Newbold, 1992) pri riadenom ovplyvňovaní funkčného vývoja tráviaceho traktu mláďat (Fonty a i., 1983) a pri cieleňom potláčaní nežiadúcej mikroflóry (Underdahl a i., 1982; Lidbeck a i., 1987). Z laktobacilov sú v gnotobiotických preparátoch najčastejšie využívané *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis* a *L. delbrueckii* (Jonsson a Conway, 1992). Veľmi účinné a perspektívne sa ukazuje využitie laktobacilov v prevencii a terapii ochorení spôsobených patogénnymi mikroorganizmami (Watkins a i., 1982), predovšetkým u diarhoického syndrómu mláďat hospodárskych zvierat (Gilliland a i., 1980). Aplikácia probiotík na báze laktobacilov je biotechnologickou metódou, ktorá prirodzeným spôsobom priaznivo ovplyvňuje zdravotný stav mláďat s pozitívnym dopadom na životné prostredie. Medzi vlastnosťami, ktorými by mal disponovať mikroorganizmus použitý ako probiotikum, uvádza Fuller (1989) schopnosť prospešne pôsobiť na hostiteľa, prežívať a metabolizovať v prostredí intestinálneho traktu, ale podľa Kmeť a kol. (1986) rozhodujúcim faktorom selekcie je adherencia na bunky gastrointestinálneho traktu. Adherencia laktobacilov k epiteliálnemu povrchu tráviaceho traktu vytvára predpoklady pre úspešnú kolonizáciu a probiotickú účinnosť.

V tejto práci podávame informatívne zistenia o vplyve inokulácie *L. casei* na kolonizáciu črevného traktu a vybrané ukazovatele metabolického profilu gnotobiotických a konvenčných jahniat z hľadiska jeho možného využitia v prevencii diarhoického syndrómu mláďat bakteriálnej etiológie.

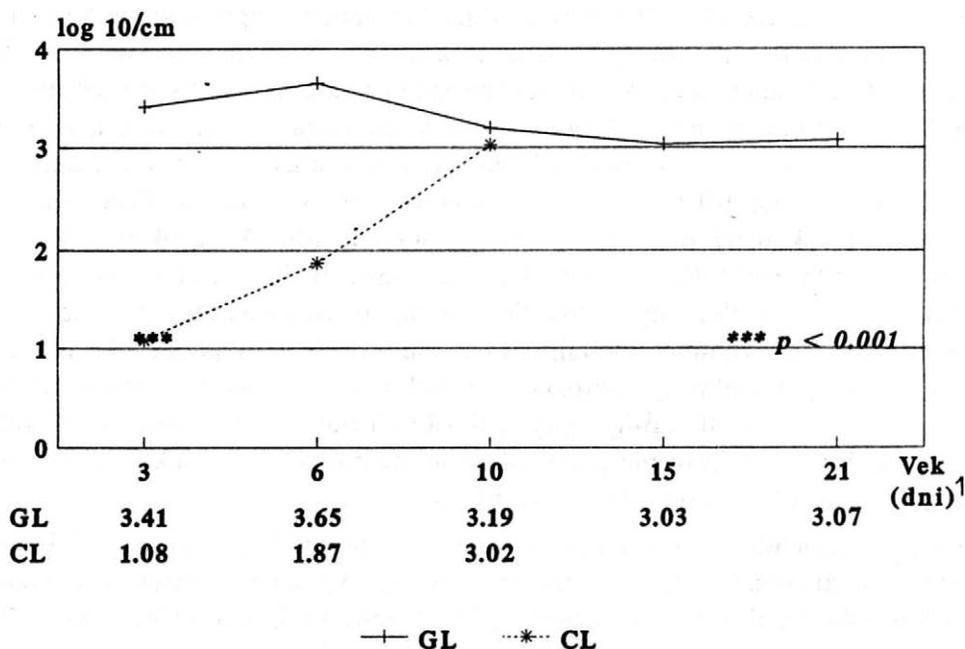
Do experimentu bolo zaradených päť gnotobiotických a tri konvenčné jahňatá. Gnotobiotické jahňatá boli získané hysterektómiou a odchovávané v izolátoroch (Bomba a i., 1993). Napájané boli komerčným plnotučným mliekom (PMV, Hradec Králové) *ad libitum*. Konvenčné jahňatá boli ustajnené v kotercoch spolu s matkami a prijímali materské mlieko *ad libitum*.

Konvenčné a gnotobiotické jahňatá dostávali denne 2 ml inokula, ktoré obsahovalo  $1 \times 10^8$  zárodkov kmeňa *L. casei* 294/89, ktorý bol izolovaný z rektálneho výteru teľaťa vo veku dva dni (Čížek, 1993). Kmeň bol vybraný z celkového počtu 324 sledovaných laktobacilových kmeňov a testovaný rutinnými biochemickými metódami.

Vo veku 3, 6, 10, 15 a 21 dní boli od jahniat oboch skupín odobrané vzorky krvi z *vena jugularis* nalačno pred ranným kŕmením. V rovnakom vekovom intervale bolo z každej skupiny odporazené jedno jahňa tri hodiny po nakŕmení. Ihneď po odporazení boli odobrané vzorky duodéna, jejuna, ilea a kólony ( $10\text{ cm}^2$ ) a ich obsahu. Vzorky tkanív na stanovenie počtu laktobacilov adherovaných na stenu boli trikrát premyté pri miernom miešaní s 0,15M PBS (pH 7,2) a potom bol vykonaný zoškrab sliznice krycím sklíčkom. Výťažok bol vložený do 10 ml 0,15M PBS (pH 7,2) s 1 % Tweenu a následne bolo urobené desiatkové riedenie. Celkové bielkoviny a albumín boli stanovené Biola-testami (Lachema, Brno), celkové sérové imunoglobulíny metódou turbidimetrie podľa M c E w a n a a i. (1970). Kyselina pyrohroznová, kyselina acetocetová, kyselina mliečna, kyselina octová a kyselina  $\beta$ -hydroxymaslová boli stanovené metódou kapilárnej izotachoforézy. Na stanovenie počtu laktobacilov bol použitý selektívny Rogoza agar a na mikrobiálnu kontrolu VL krvný agar.

Počet *L. casei* adherovaných na črevný epitel gnotobiotických jahniat ( $3,41\text{ log }10/\text{cm}^2$ ) bol vo veku tri dni v priemere signifikantne vyšší ( $p < 0,001$ ) v porovnaní s počtom laktobacilov u konvenčných jahniat (obr. 1). U gnotobiotov sa počty adherovaných *L. casei* pohybovali vo vekovej dynamike na úrovni, ktorú dosiahli už vo veku tri dni, zatiaľ čo u konvenčných jahniat sa laktobacily na úroveň gnotobiotov dostali až vo veku 10 dní. Aj počty laktobacilov kolonizujúcich jednotlivé úseky čreva (obr. 2) boli v priemere vyššie u gnotobiotických jahniat so signifikantnými rozdielmi v jejune a kólone ( $p < 0,05$ ). U oboch skupín jahniat bola v priemere populácia adherovaných laktobacilov najvyššia v ileu a kólone. Populácia *L. casei* kolonizujúca duodénum bola u gnotobiotov najvyššia vo veku tri dni ( $3,49\text{ log }10/\text{cm}^2$ ), v jejune ( $3,74\text{ log }10/\text{cm}^2$ ) a ileu ( $4,37\text{ log }10/\text{cm}^2$ ) vo veku šesť dní a v kólone ( $4,7\text{ log }10/\text{cm}^2$ ) vo veku 15 dní (obr. 3). U konvenčných jahniat narastala populácia laktobacilov kolonizujúcich jednotlivé úseky čreva s vekom (obr. 4).

Počet *L. casei* v črevnom obsahu gnotobiotických jahniat dosahoval v priemere vyšších hodnôt ako počet laktobacilov u konvenčných zvierat, ale rozdiely neboli signifikantné. Najvyššie počty laktobacilov boli zaznamenané u oboch skupín vo veku 10 dní (gnotobiotické jahňatá  $5,9\text{ log }10/\text{ml}$  a konvenčné  $4,6\text{ log }10/\text{ml}$ ). Populácia *L. casei* v obsahu jednotlivých úsekov čreva bola u gnotobiotov v priemere vyššia ako počty laktobacilov u konvenčných zvierat so signifikantnými rozdielmi v jejune ( $p < 0,01$ ). Najvyššie počty laktobacilov v obsahu boli u gnotobiotov v kólone ( $6,17\text{ log }10/\text{ml}$ ), u konvenčných jahniat v ileu ( $4,71\text{ log }10/\text{ml}$ ). Počet *L. casei* v obsahu jednotlivých úsekov čreva bol u gnotobiotických jahniat najvyšší v duodéne vo veku 21 dní ( $5,6\text{ log }10/\text{ml}$ ), v jejune vo veku šesť dní ( $6,3\text{ log }10/\text{ml}$ ), v ileu vo veku tri dni ( $6,2\text{ log }10/\text{ml}$ ) a v kólone vo veku 10 dní ( $6,85\text{ log }10/\text{ml}$ ). Počet laktobacilov v obsahu jednotlivých úsekov čreva



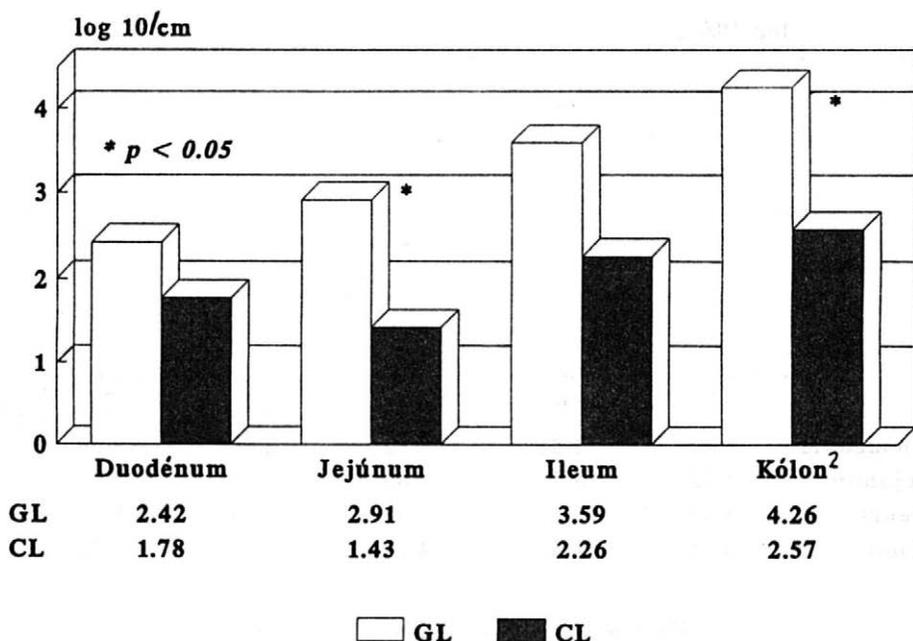
1. Počty laktobacilov kolonizujúcich črevný epitel gnotobiotických (GL) a konvenčných (CL) jahniat – Lactobacillus counts colonizing intestinal epithelium of gnotobiotic (GL) and conventional (CL) lambs  
 age (days)

konvenčných jahniat bol najvyšší v duodéne (3,3 log 10/ml), jejune (4,2 log 10/ml) a kólone (6,3 log 10/ml) vo veku 10 dní a v ileu (6,23 log 10/ml) vo veku šesť dní.

Koncentrácia kyseliny mliečnej v obsahu jejuna gnotobiotov kulminovala vo veku tri týždne (13,19 mmol/l), pričom vo veku tri a šesť dní dosiahla u konvenčných jahniat vyšších hodnôt.

Zo sledovaných parametrov imunobiokovínového profilu boli u konvenčných jahniat zaznamenané signifikantne vyššie hladiny celkových bielkovín vo veku tri ( $p < 0,05$ ) a šesť dní ( $p < 0,001$ ) a celkových sérových imunoglobulínov vo veku tri dni ( $p < 0,01$ ). Hladiny albumínu v sére konvenčných zvierat boli vyššie, ale rozdiely neboli signifikantné.

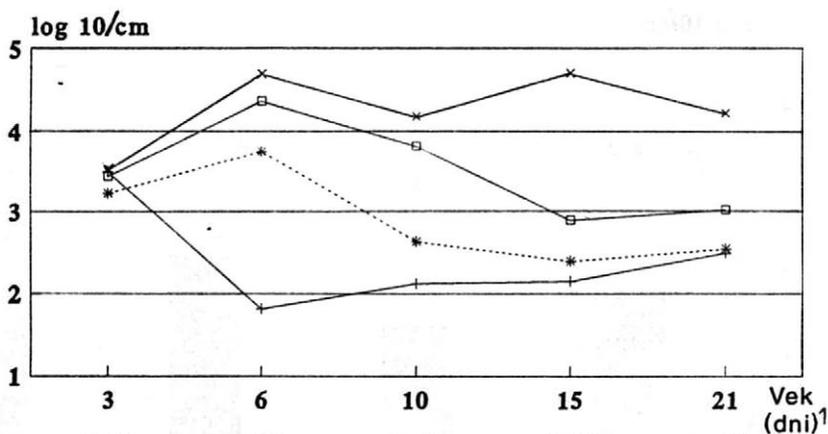
Z parametrov energetického profilu bola zistená signifikantne vyššia koncentrácia kyseliny octovej v sére gnotobiotických jahniat v porovnaní s konvenčnými jahňatami vo veku tri ( $p < 0,05$ ) a šesť dní ( $p < 0,01$ ). Rozdiely v koncentrácii kyseliny pyrohroznovej, acetoctovej, mliečnej a  $\beta$ -hydroxymaslovej v sére sledovaných skupín jahniat neboli signifikantné. U gnotobiotických jahniat došlo vo vekovom intervale 10–15 dní k dvojnásobnému vzostupu koncentrácie kyseliny



2. Kolonizácia jednotlivých lokalít čreva gnotobiotických (GL) a konvenčných (CL) jahniat laktobacilmi – Colonization of different segments of intestine of gnotobiotic (GL) and conventional (CL) lambs by lactobacilli  
<sup>1</sup>colon

mliečnej v sére so súčasným poklesom koncentrácie kyseliny octovej na jednu štvrtinu.

Populácia laktobacilov adherovaných na epitel čreva i v jeho obsahu dosiahla u gnotobiotických jahniat v porovnaní s konvenčnými zvieratami vyšších počtov tak z hľadiska vekovej dynamiky, ako aj pri posudzovaní jednotlivých lokalít tráviaceho traktu. Podobnú skutočnosť zaznamenal P o l l m a n n a i. (1980a, b) u konvenčných a gnotobiotických ciciakov. Tento fakt možno vysvetliť tým, že *L. casei* predstavoval u gnotobiotov jedinú, homogénnu populáciu tráviaceho traktu. Naproti tomu, konvenčné jahňatá boli osídlené okrem inokulácie aj prirodzeným spôsobom kontaktom s okolím. Hoci populácia laktobacilov je dominantnou u konvenčných mláďat v prvých dňoch života, ekosystém tráviaceho traktu vytvárajú aj ďalšie skupiny mikroorganizmov so spleťmi vzájomnými antagonistickými a synergickými vzťahmi navodzujúcimi bakteriálnu rovnováhu. T a n n o c k a i. (1990) zistili, že väčšina laktobacilov črevného traktu ciciakov pochádza z tráviaceho traktu matiek. Uvedený fakt chceli P e d e r s e n a i. (1992) využiť cestou skrmovania zmesi laktobacilov prasniciam v pre- a postnatálnom období. Vybrané kmene boli vylučované vo fečes v relatívne nízkych



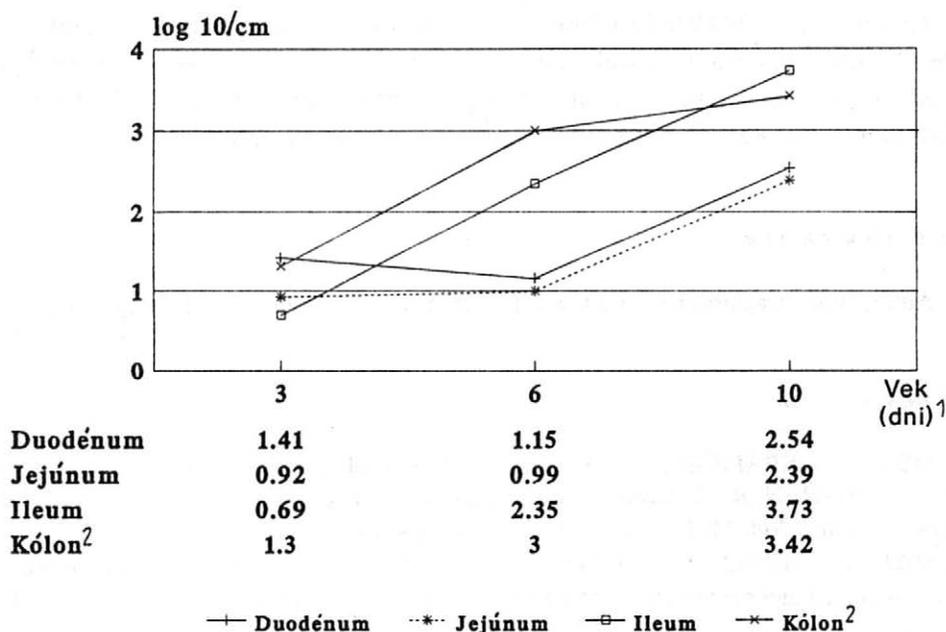
	3	6	10	15	21	Vek (dni) <sup>1</sup>
Duodenum	3.49	1.81	2.12	2.15	2.49	
Jejunum	3.22	3.74	2.63	2.39	2.54	
Ileum	3.43	4.37	3.81	2.89	3.02	
Kolon <sup>2</sup>	3.51	4.69	4.18	4.7	4.22	

—+ Duodenum    ···· Jejunum    —□ Ileum    —x Kolon<sup>2</sup>

3. Kolonizácia jednotlivých lokalít čreva gnotobiotických (GL) jahniat *L. casei* – Colonization of different segments of intestine of gnotobiotic (GL) lambs by *L. casei*  
<sup>1</sup>age (days), <sup>2</sup>colon

počtoch, neboli schopné nahradiť prirodzenú laktoflóru prasníc a nedostali sa do tráviaceho traktu mláďat v signifikantných počtoch. Po poslednej aplikácii sa testované kmene už neobjavili vo fécas, na koži ani v prostredí. Hoci rozdiely perzistencie medzi jednotlivými aplikovanými kmeňmi boli zjavné, nedošlo k permanentnej kolonizácii.

Najvyššie počty laktobacilov adheroovaných na epitel čreva i v črevnom obsahu boli z hľadiska lokalizácie v dolných partiách tenkého čreva a v kólone. Naše výsledky sú porovnateľné s údajmi iných autorov. Gilliland a i. (1980) zistili u teliat v prvých dňoch života, že populácia laktobacilov v tenkom čreve dosiahla v priemere hodnôt 6,55 log 10/g a v hrubom čreve 8,56 log 10/g. U teliat, ktoré boli inokulované zárodkami *L. acidophilus* sa počty laktobacilov v tenkom čreve pohybovali v rozpätí 6,94–7,46 log 10/g a v hrubom čreve 8,44–8,51 log 10/g. P o l l m a n n a i. (1980 a) inokulovali gnotobiotické ciciaky kmeňom *L. acidophilus* DDS 1 a pozorovali, že populácia laktobacilov v hrubom čreve dosiahla signifikantne vyšších počtov ( $p < 0,001$ ) ako v tenkom čreve. V ďalšej štúdií (P o l l m a n n a i., 1980b) bol uvedený *L. casei* DDS 1 inokulovaný konvenčným ciciakom a došlo k zvýšeniu počtu laktobacilov vo fécas ( $p < 0,05$ ). S a r r a a i. (1991) pri sledovaní kolonizácie žalúdka, ilea a céka



4. Kolonizácia jednotlivých lokalít čreva konvenčných (CL) jahniat laktobacilmi – Colonization of different segments of intestine of conventional (CL) lambs by lactobacilli  
<sup>1</sup>age (days), <sup>2</sup>colon

konvenčných ciciakov po inokulácii *L. acidophilus*, *L. reuteri* a *L. salivarius* zistili v prvých dvoch dňoch života najvyššie počty laktobacilov v céku.

Lyons (1986) a Fallon (1986) vysvetľujú mechanizmus účinku probiotík produkciou kyseliny mliečnej a poklesom pH, produkciou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a jeho antibakteriálnym účinkom, produkciou prirodzených antibiotických substancií (bakteriocínov), antienterotoxickou aktivitou a zabránením kolonizácie črevného traktu adhéziou na epitel čreva. Pri sledovaní koncentrácie kyseliny mliečnej v obsahu jejuna sme u gnotobiotických jahniat vo vekovom intervale 6–15 dní života zistili približne trojnásobný vzostup koncentrácie kyseliny mliečnej, ktorý bol v intervale 10–15 dní veku jahniat sprevádzaný takmer dvojnásobným vzostupom koncentrácie kyseliny mliečnej v sére a poklesom koncentrácie kyseliny octovej na jednu štvrtinu.

Signifikantne vyššie hladiny celkových bielkovín a nižšie hladiny celkových sérových imunoglobulínov gnotobiotických jahniat v porovnaní s konvenčnými zvieratami sú odrazom rozdielov spôsobu výživy jednotlivých skupín zvierat a sú porovnateľné s našimi predchádzajúcimi výsledkami (Bombai, 1993, 1994). Signifikantné rozdiely koncentrácie kyseliny octovej v sére jahniat súvisia pravdepodobne s rozdielnou skladbou mikrofóry tráviaceho traktu.

Kmeň *L. casei* 294/89, ktorý bol použitý na inokuláciu zvierat preukázal schopnosť kolonizovať tráviaci trakt jahniat. V ďalšej práci bol testovaný inhibičný efekt uvedeného kmeňa voči enteropatogénnym *E. coli* u gnotobiotických jahniat. Dosiahnuté výsledky budú predmetom pripravovanej publikácie.

## PodĎakovanie

Autori práce vyjadrujú vďaku firme POPPEY CONEXION za prípravu bahníc.

## Literatúra

BOMBA, A. – KRÁLÍČEK, L. – KONIAROVÁ, I. – LEŠNÍK, F. – POŠIVÁK, J. – BUČKO, V. – ŽITŇAN, R.: Získavanie a odchov gnotobiotických jahniat a ich využitie vo veterinárnej medicíne. *Vet. Med. – Czech*, 38, 1993: 403–411.

BOMBA, A. – ŽITŇAN, R. – KONIAROVÁ, I. – SOMMER, A.: Nitrogen and energy profile of conventional and gnotobiotic lambs in the period of milk nutrition. *Arch. Anim. Nutr.*, 1994, (v tlači).

BURGSTALLER, G. – FERSTL, R. – ALPS, H.: Zum Zusatz von Milchsäurebakterien (*Streptococcus faecium* SF-68) im Milchaustauschfüttermittel für Mastkälber. *Züchtungskunde*, 56, 1984: 156–162.

ČÍŽEK, M.: Vplyv probiotík na tráviaci trakt hovädzieho dobytku. [Kandidátska dizertácia.] Košice, 1993. – Univerzita veterinárskeho lekárstva.

FALLON, R.: Calf – the European experience. In: 2nd Annual Biotechnol. Symp. Alltech. Inc. Nicholasville, Kentucky, 1986.

FONTY, G. – GOUET, P. – JOUANY, J. – SENAUD, J.: Ecological factors determining establishment of cellulolytic bacteria and protozoa in the rumen of meroxenics lambs. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 1983: 213–223.

FULLER, R.: A Review – Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bact.*, 66, 1989: 365–378.

GILLILAND, S. E. – BRUCE, B. B. – BUSH, L. J. – STALEY, T. E.: Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. *J. Dairy Sci.*, 63, 1980: 964–972.

JONSSON, E. – CONWAY, P.: Probiotics for pigs. In: FULLER, R. (ed.): Probiotics the scientific basis. Chapman and Hall, London, 1992: 259–316.

KMEŤ, V. a kol.: Spôsob výberu adherentných bachorových mikroorganizmov pre prípravu kolonizačných preparátov. Autorské osvedčenie č. 248 207, 1986.

LIDBECK, A. – GUSTAFSSON, J. A. – NORD, C. E.: Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the human oropharyngeal and intestinal microflora. *Scand. J. Infect. Dis.*, 19, 1987: 531–537.

LYONS, T. P.: Biotechnology in the feed industry. In: 2nd Annual Biotechnol. Symp. Alltech. Inc. Nicholasville, Kentucky, 1986.

McEWAN, A. D. – FISHER, E. W. – SELMAN, J. E.: Observations on the immunoglobulin levels of neonatal calves and their relationship to disease. *J. Comp. Path.*, 80, 1970: 259–265.

- PEDERSEN, K. – CHRISTENSEN, G. W. – STEFFENSEN, M. – SCHYUM, P. – JOHANSEN, A. K.: Transfer of lactic acid bacterial strains from the feed to the sow, the environment, and the piglets.
- POLLMANN, D. S. – DANIELSON, D. M. – WREN, W. B. – PEO, E. R. Jr. – SHAHANI, K. M.: Influence of *Lactobacillus acidophilus* inoculum on gnotobiotic and conventional pigs. J. Anim. Sci., 51, 1980a: 629–637.
- POLLMANN, D. S. – DANIELSON, D. M. – PEO, E. R. Jr.: Effect of *Lactobacillus acidophilus* on starter pigs fed a diet supplemented with lactose. J. Anim. Sci., 51, 1980b: 638–644.
- SARRA, P. G. – CANTALUPO, R. – MASSA, S. – TROVATELLI, L. D.: Colonization of the gastrointestinal tracts of conventional piglets by *Lactobacillus* strains. J. Gen. Appl. Microbiol., 37, 1991: 219–223.
- SKŘIVANOVÁ, V. – MACHÁŇOVÁ, L.: Vliv probiotika *Lactobacillus acidophilus* na užítkovost a parametry bacherové tekutiny telat. Živoč. Vyr., 35, 1990: 87–94.
- SVOZIL, B. – DANĚK, P. – KUMPRECHT, I. – ZOBÁČ, P.: Účinnost odstupňovaných hladin baktérií *Streptococcus faecium* M-74 ve výživě telat. Živoč. Vyr., 32, 1987: 265–271.
- TANNOCK, G. W. – FULLER, R. – PEDERSEN, K.: *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. Appl. Environ. Microbiol., 56, 1990: 1310–1316.
- UNDERDAHL, N. R. – TORRES-MEDINA, A. – DOSTER, A. R.: Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in control of *Escherichia coli* – induced diarrhea in gnotobiotic pigs. Amer. J. Vet. Res., 43, 1982: 2227–2232.
- WALLACE, R. J. – NEWBOLD, C. J.: Probiotics for ruminants. In: FULLER, R. (ed.): Probiotics the scientific basis. London, Chapman and Hall 1992: 317–353.
- WATKINS, B. A. – MILLER, B. F. – NEIL, D. H.: *In vivo* inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *Escherichia coli* in gnotobiotic chicks. Poultry Sci., 61, 1982: 1298–1308.

Došlo 12. 5. 1994

BOMBA, A. – KRAVJANSKÝ, I. – KAŠTEL, R. – ČÍŽEK, M. – KAPITANČIK, B. – JUHÁSOVÁ, Z. – HERICH, R. – ŽITŇAN, R. – BUČKO, V. (Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice):

**Colonization of the digestive tract of gnotobiotic and conventional lambs with the defined lactoflora.**

Vet. Med. – Czech, 39, 1994 (11): 701–710.

The effect of *Lactobacillus casei* 249/89 on the colonization of the intestinal tract and selected indicators of the metabolic profile of gnotobiotic and conventional lambs from the viewpoint of its possible utilization in the prevention of diarrhoeal syndrome of bacterial etiology in young animals has been studied.

Five gnotobiotic and three conventional lambs were used in these studies. The lambs were slaughtered at 3, 6, 10, 15 and 21 days of age.

The population of *L. casei* colonizing the intestinal epithelium was at the age dynamics on average higher in gnotobiotic lambs compared with lactobacilli in con-

ventional lambs (Fig. 1). The significant difference ( $p < 0.001$ ) was noted at the age of 3 days (gnotobiotic lambs =  $3.40 \log 10/\text{cm}^2$  and conventional lambs =  $1.08 \log 10/\text{cm}^2$ ). Also the counts of lactobacilli colonizing individual sections of the intestine (Fig. 2) was on average higher in gnotobiotics with significant differences in jejunum and colon ( $p < 0.05$ ). In both groups, the highest number of lactobacilli was observed on the intestinal epithelium in lower sections of the digestive tract. In gnotobiotics, the population of *L. casei* colonizing the duodenum was highest at the age of 3 days ( $3.49 \log 10/\text{cm}^2$ ), in jejunum ( $3.74 \log 10/\text{cm}^2$ ) and in ileum  $4.37 \log 10/\text{cm}^2$  at the age of 6 days and in the colon ( $4.7 \log 10/\text{cm}^2$ ) at the age of 15 days (Fig. 3). In conventional lambs, the population of lactobacilli colonizing individual sections of the intestine was increasing with age (Fig. 4).

The number of *L. casei* in the intestinal content of gnotobiotic lambs was on average higher than that in conventional animals but the differences were not significant. In both groups, the highest number of lactobacilli was noted at the age of 10 days (gnotobiotic lambs =  $5.9 \log 10/\text{ml}$ ; the conventional lambs =  $4.6 \log 10/\text{ml}$ ). From the viewpoint of individual sections of the intestine, the population of *L. casei* in the intestinal content of gnotobiotic lambs was higher than the lactobacilli count in conventional animals with significant difference in jejunum ( $p < 0.01$ ). In gnotobiotics, the highest lactobacilli count was in the colon ( $6.17 \log 10/\text{ml}$ ); in conventional lambs in the ileum ( $4.71 \log 10/\text{ml}$ ). The number of *L. casei* in the content of individual intestinal sections was in gnotobiotics highest in the duodenum at the age of 21 days ( $5.6 \log 10/\text{ml}$ ), in the jejunum at the age of 6 days ( $6.3 \log 10/\text{ml}$ ), in the ileum at the age of 3 days ( $6.2 \log 10/\text{ml}$ ) and in the colon at the age of 10 days ( $6.85 \log 10/\text{ml}$ ). The lactobacilli count in the intestinal content of conventional lambs was highest in the duodenum ( $3.3 \log 10/\text{ml}$ ), in the jejunum ( $4.2 \log 10/\text{ml}$ ) and in the colon ( $6.3 \log 10/\text{ml}$ ) at the age of 10 days and in the ileum ( $6.23 \log 10/\text{ml}$ ) at the age of 6 days.

The lactic acid concentration in the jejunal content was higher in conventional lambs at the age of 3 and 6 days, respectively, and in gnotobiotics it culminated at the age of 3 weeks ( $13.19 \text{ mmol/l}$ ). In conventional lambs, significantly higher total protein levels in serum were noted at the age of 3 ( $p < 0.05$ ) and 6 days ( $p < 0.001$ ), respectively, and those of total serum immunoglobulins at the age of 3 days ( $p < 0.01$ ). In gnotobiotic lambs, the serum level of acetic acid was significantly higher at the age of 3 ( $p < 0.05$ ) and 6 days ( $p < 0.01$ ), respectively. In these animals, the serum level of lactic acid has doubled at the age 10 to 15 days with continuous decrease of the acetic acid level to one fourth.

lambs; gnotobiot; *Lactobacillus casei*; colonization; digestive tract

---

Contact Address:

MVDr. Alojz B o m b a , CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny,  
Hlinkova 1/A, 041 81 Košice, Slovak Republic  
Tel. 095/374 29, fax 095/318 53

---

# NEKROLOG

## Za doc. Ing. MILANOM BARANOM, CSc.

S hlbokým zármutkom a žiaľom sme prijali smutnú správu, že 17. augusta 1994 vo veku nedožitých 66 rokov dotíкло šľachetné srdce docenta Ing. Milana Barana, CSc., spoluzakladateľa a dlhoročného zástupcu riaditeľa Ústavu experimentálnej veterinárnej medicíny v Košiciach.

Doc. Ing. Milan Baran, CSc. sa narodil 22. septembra 1928 vo Vinnom, okres Michalovce. Základné vzdelanie získal na Zemplíne, v Bánovciach nad Ondavou. Gymnaziálne štúdiá ukončil maturitou v roku 1948. Odborné vysokoškolské vzdelanie získal na Vysokej škole poľnohospodárskeho a lesníckeho inžinierstva v Košiciach. Do rodného kraja sa



vrátil s diplomom poľnohospodárskeho inžiniera, aby sa 12 rokov venoval výchove poľnohospodárskeho dorastu ako učiteľ aj riaditeľ Strednej poľnohospodárskej technickej školy v Čakľove, kde ku koncu pôsobenia ďalej študoval formou externej aspirantúry. Keď mu potom, už ako externému aspirantovi s bohatými pedagogickými skúsenosťami, ponúkli miesto na Vysokej škole veterinárskej v Košiciach, prijal ho. Po získaní vedeckej hodnosti kandidáta vied sa na Vysokej škole veterinárskej v Košiciach habilitoval na docenta.

Vo vedeckovýskumnej práci sa venoval problematike racionálnej chemizácie objemových krmovín, hlavne silážnej kukurice, efektu použitých diferencovaných dávok priemyselných hnojív a herbicídov. Vyvinul a prakticky overil technológiu pestovania miešanky kukurice a sóje. Riešila sa tým problematika účelného zlepšenia nutričných vlastností dorábaných objemových krmovín. V posledných rokoch svoju vedeckovýskumnú činnosť orientoval na výrobu nutrične a dieteticky vysokohodnotného sena z viacročných krmovín za použitia moderných dehydratačných prípravkov, ako aj na riešenie problémov kontaminácie krmovín plesňami a ich dekontaminácie.

Záveru, ku ktorým dospel, sa využívajú v praxi a zaujali odborníkov u nás i v zahraničí na základe publikovaných 31 pôvodných vedeckých a 43 odborných prác.

Ako z uvedeného vyplýva, doc. Ing. Milan Baran, CSc. sa vypracoval na erudovaného a uznávaného fytopatológa a už začiatkom 70. rokov mal postavenie vedúceho vedeckého pracovníka. Ako taký stál pri zrode a postupnom konštituovaní Ústavu experimentálnej veterinárnej medicíny v Košiciach. Účinne pomáhal budovať jeho objekty a získaval potrebné vedecké a organizačné skúsenosti, pričom sa významne podieľal na orientácii a profilovaní oddelenia veterinárnej dietetiky ústavu. Od roku 1970 až do konca roku 1993 zastával funkciu zástupcu riaditeľa Ústavu experimentálnej veterinárnej medicíny v Košiciach, ktorú vykonával naozaj úspešne, so zmyslom pre tímovú prácu, so zmyslom a citom pre spravodlivosť, s taktom a vysokou náročnosťou voči spolupracovníkom i voči sebe samému.

Široký rozhľad vo vednom odbore, ako aj praxou overené výsledky, názory a organizačné skúsenosti úspešne využíval pri vykonávaní funkcií v komisiách, výboroch i radách a z nich hlavne v redakčnej rade vedeckého časopisu Poľnohospodárstvo. Predsedal redakčnej rade Veterinárskych správ a zostavoval Zborník vedeckých prác Ústavu experimentálnej veterinárnej medicíny v Košiciach. Pod jeho vedením vydal ÚEVM 10 ročníkov Zborníka a sedem ročníkov Správ. Za bohatú výskumnú a pedagogickú činnosť bol ocenený radom uznaní, vyznamenaní a titulov.

V docentovi Ing. Milanovi Baranovi, CSc. stráca nielen Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny v Košiciach a veterinárska i poľnohospodárska komunita, ale aj celá spoločnosť šľachetného človeka so všetkými atribútmi výborného vedeckého a výskumného pracovníka, učiteľa, kolegu a priateľa, ktorý pre našu spoločnosť vytvoril trvalé hodnoty. Jeho meno a vykonané dielo zostanú natrvalo zapísané v histórii Ústavu experimentálnej veterinárnej medicíny v Košiciach, poľnohospodárskeho školstva a v celej vedeckovýskumnej základni poľnohospodárskeho rezortu Slovenskej republiky.

Spomienky na doc. Ing. Milana Barana, CSc., zostávajú i naďalej v našich srdciach.

*Za spolupracovníkov ÚEVM v Košiciach  
Doc. MVDr. Imrich M a r a č e k , DrSc.,  
riaditeľ ústavu*



## **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**

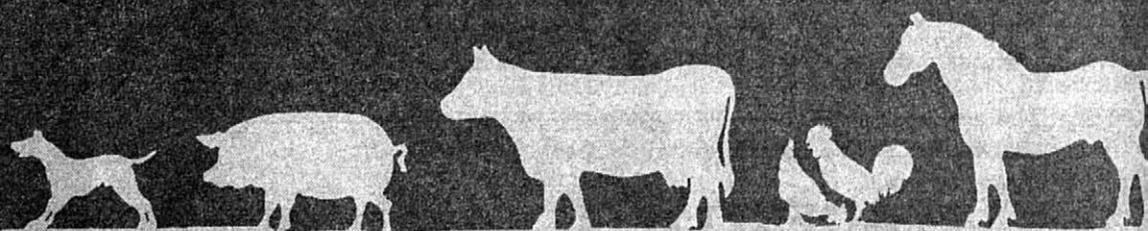
**tel.: 258 342**

**fax: 207 229**





# VETEX



## 1. mezinárodní veterinární veletrh

*1. Ročník  
společně  
s Techagrem!*

Brno - Výstaviště  
25. 4. - 29. 4. 1995



Brněnské veletrhy  
a výstavy a.s.

### Informace:

Výstaviště 1, 647 00 Brno

Telefon: 05/ 4115 2831

Fax: 05/ 4115 3059

## OBSAH – CONTENTS

Maraček I., Naď P., Gréserová G.: Research Institute of Experimental Veterinary Medicine .....	631
Naď P., Gréserová G., Ružíková A.: Zoznam publikácií za rok 1993 a I. polrok 1994 .....	637
Choma J., Gréserová G.: International scientific and technical co-operation in 1993 .....	649
Lazár L., Maraček I.: Growth and development of follicles in different phases of the oestrous cycle in cows in relation to the presence of the corpus luteum and an oestrogen-dominant follicle – Rast a vývoj folikulov kráv v rôznych fázach pohlavného cyklu v závislosti od prítomnosti žltého telieska alebo estrogén-dominantného folikulu .....	653
Závadová J., Švrček Š.: Zdokonalenie laboratórnej diagnostiky besnoty a titrácie vírusu besnoty – The improvement of laboratory diagnostics of rabies and titration of rabies virus .....	663
Venglovský J., Juriš P., Sokol J.: Prieskum efektívnosti niektorých čistiarní odpadových vôd pri farmách na Slovensku – Efficiency survey of some sewage treatment plant systems on pig farms in Slovakia. ....	677

## INFORMACE – STUDIE – SDĚLENÍ

Vilček Š.: Vývoj PCR testov na detekciu BHV-1, BRSV a pestivírusov – Development of PCR assays for detection of BHV-1, BRSV and pestiviruses ..	687
Bomba A., Kravjanský I., Kašteľ R., Čížek M., Kapičančík B., Juhásová Z., Herich R., Žitňan R., Bučko V.: Kolonizácia tráviaceho traktu gnotobiotických a konvenčných jahniat definovanou laktoflórou – Colonization of the digestive tract of gnotobiotic and conventional lambs with the defined lactoflora .....	701

## NEKROLOG

Maraček I.: Za doc. Ing. Milanom Baranom, CSc. ....	711
---	-----

## 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 Ústavu experimentální veterinární medicíny v Košicích**

---

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.: 02/25 75 41 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Pražská 108, 266 01 Beroun, tel.: 0311/240 15 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1994

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