

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

7

VOLUME 40 (LXVIII)
PRAHA
JULY 1995
CS ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření České akademie zemědělských věd a s podporou Ministerstva zemědělství České republiky

An international journal published by the Czech Academy of Agricultural Sciences and with the promotion of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic

Editorial Board – Redakční rada

Chairman – Předseda

Prof. MVDr. Karel Hruška, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Members – Členové

Prof. MVDr. Jan Bouda, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Ivan Herzig, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumír Hoffrek, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s., Jílové u Prahy, Czech Republic

Prof. MVDr. Zdeněk Věžík, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

Cíl a odborná náplň: Časopis uveřejňuje původní vědecké práce a studie typu review ze všech oblastí veterinární medicíny.

Časopis Veterinární medicína uveřejňuje práce v češtině, slovenštině a angličtině.

Časopis je citován v bibliografickém časopise Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences a abstrakty z časopisu jsou zahrnuty v těchto databázích: Agri, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 40 vychází v roce 1995.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Zdeňka Radošová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41–9, fax: 02/25 70 90. Den doručení rukopisu do redakce je uváděn jako datum přijetí k publikaci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a měly by být zaslány na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1995 je 396 Kč.

Aims and scope: The journal publishes experimental papers and reviews from all fields of veterinary medicine.

The journal Veterinární medicína publishes original scientific papers written in Czech, Slovak or English.

The journal is cited in the bibliographical journal Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, abstracts from the journal are comprised in the databases: Agri, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicity: The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 40 appearing in 1995.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: Ing. Zdeňka Radošová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41–9, fax: 02/25 70 90. The day the manuscript reaches the editor for the first time is given upon publication as the date of reception.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1995 is 92 USD (Europe), 96 USD (overseas).

METABOLIC PROFILE IN THE PERIPARTAL PERIOD IN COWS WITH AFTERBIRTH RETENTION AND WITHOUT IT

METABOLICKÝ PROFIL V PERIPARTÁLNÍM OBDOBÍ U KRAV BEZ RETENCE A S RETENCÍ SEKUNDIN

E. Kudláč, M. Sakour, J. Čanderle

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Blood samples were taken and subjected to biochemical analysis in the crossbred cows of the Red-Pied, Black-Pied or Holstein-Friesian breed raised on a large farm under standard conditions, with the average annual milk yield of 4,300 kg milk, and divided into two groups – cows with afterbirth retention and without it; the samples were taken in the last period of pregnancy (since day 245), during parturition, and within the first 50 days *post partum*. In both groups, the values of acid-base balance and metabolic profile mostly ranged within the interval of reference values, nevertheless there were certain trends and differences in absolute values as well as in the dynamics of changes, but they did not always show a doubtless character and the same significance. The cows with afterbirth retention exhibited a trend of a more expressive decrease in partial pressure CO_2 , actual acid output and phosphorus level. Glucose level at the end of pregnancy was statistically significantly lower ($P < 0.01$), cholesterol level also decreased ($P < 0.05$). On the other hand, the cows with afterbirth retention had, at the end of pregnancy, statistically significantly higher concentrations of urea and creatinine ($P < 0.05$ – 0.01), a higher bilirubin level and enzyme activities of acid phosphatase, and particularly of aspartate aminotransferase and lactate dehydrogenase ($P < 0.05$ – 0.01). There were insignificant differences in the concentrations of total protein, calcium, magnesium and enzyme activity of alkaline phosphatase and gammaglutamyl transferase.

cattle; peripartal period; afterbirth retention; acid-base balance; metabolic profile

ABSTRAKT: U krav kříženek červenostrakatého, černostrakatého nížinného, respektive holštýnskofřízského plemene chovaných za standardních podmínek velkochovu s průměrnou roční dojivostí 4 300 kg mléka a rozdělených do dvou skupin – krávy bez retence a s retencí sekundin – byla v posledním období březosti (od 245. dne), za porodu a prvních 50 dní po porodu získávána krev a podrobena biochemické analýze. V obou skupinách zjištěné hodnoty acidobazické rovnováhy a metabolického profilu se vesměs pohybovaly v rozmezí širší referenčních hodnot, nicméně byly zjišťovány určité tendence a rozdílnosti jak v absolutních hodnotách, tak i v dynamice změn, které však neměly vždy jednoznačný charakter a stejnou průkaznost. U krav s retencí sekundin byla tendence k výraznějšímu poklesu parciálního tlaku CO_2 , aktuálního kyselého výlučku a hladiny fosforu. Hladina glukózy ke konci březosti byla statisticky průkazně nižší ($P < 0,01$) a podobně se snížila i hladina cholesterolu ($P < 0,05$). Naopak u krav s retencí sekundin byla ke konci březosti statisticky průkazně vyšší koncentrace močoviny a kreatininu ($P < 0,05$ – $0,01$), dále hladina bilirubinu a aktivity enzymů kyselých fosfatázy, především pak aspartátaminotransferázy a laktátdehydrogenázy ($P < 0,05$ – $0,01$). Nevýznamné rozdíly byly v koncentraci celkových bílkovin, vápníku, hořčíku a aktivity enzymů alkalických fosfatázy a gamaglutamyltransferázy.

skot; peripartální období; retence sekundin; acidobazická rovnováha; metabolický profil

ÚVOD

Velmi vážnou a relativně často se vyskytující porodní komplikací u skotu je zadržení lůžka. Přes značný pokrok a rozšíření poznatků o tomto onemocnění, zejména se zřetelem na účinnou terapii, zůstávají stále nejasné některé otázky etiologie a patogenese a tím i spolehlivě cílené prevence. Obecně se dnes má za to, že retence sekundin není onemocnění *sui generis* nebo *morbis per se*, ale klinický symptom celkového onemocnění nejednotné etiologie vznikající působením širokého komplexu rizikových faktorů (polyfaktoriálně zapříčiněný syndrom).

V rámci rozsáhlé plejády etiologických faktorů způsobujících narušení mechanismů zodpovědných za uvolnění lůžka je zdůrazňována úloha nutričních deficiencí a metabolických poruch. Podle Grunerta (1983, 1986, 1993) zvláštní význam přísluší nízké úrovni výživy a ještě více překrmování bílkovinami v posledním období březosti, deficienci minerálních látek (Ca, P), stopových prvků (Se, I) a vitaminů (A, E, beta-karoten), působení toxických látek (nitráty, aflatoxiny a xenobiotika) a metabolickým poruchám, zvláště typu acidóz a ketóz. Stejně nebo velmi podobné údaje o vztahu výživy a vzniku retence sekundin uvádějí Morrow (1986), Kudláč a Elečko (1987),

Heuwieser (1987), Arthur aj. (1989). Joosten a Hensen (1992), Kudláč (1994) a velké množství dalších autorů z dřívějších let a zabývajících se problematikou zadržení lůžka. Tyto citace však vesměs mají všeobecný charakter. Podstatně méně je však prací přímo studujících metabolický profil u krav v peripartálním období, u nichž došlo k zadržení lůžka. Dílčí údaje v tomto směru uvádějí Lotthammer (1983), Haraszi aj. (1985), Huszenica aj. (1988) a Sakour (1992). Minerálním profilem během puerperia avšak u ovcí se zabývali Krajničáková aj. (1993).

MATERIÁL A METODY

V jednom velkochovu krav, převážně kříženek červenostrakatého a černostrakatého nížinného, respektive holštýnskofřízského plemene s volným ustájením, vyrovnanou krmnou dávkou a standardní ošetrovatelskou péčí, s průměrnou roční mléčnou užitkovostí 4 300 kg mléka, jsme prováděli šetření v průběhu roku za neměněných podmínek chovu a managementu. Výživu tvořily složené krmné dávky: v zimě na 10 kg mléka dávka se sestávala z 21 kg kukuřičné siláže, 15 kg skrojkové siláže, 3 kg krmné slámy, 2,5 kg vojtěšky a 1,5 kg doplňku pro dojnice, v létě na 13 kg mléka dávku tvořilo 18 kg zelené směsi, 15 kg obilní senáže, 2,5 kg ječné slámy a 4 kg směsi pro dojnice na kus a den. Minerální výživa byla doplňována minerální směsí.

V době stání nasucho jsme odebírali krev z *vena jugularis* (termíny odběru a velikost skupin jsou uvedeny v tabulkách). Vzorky krve ke stanovení acidobazické rovnováhy jsme odebírali do heparinizovaných stříkaček, bezprostředně po odběru zchladili a v přepravkách se suchým ledem převezli do laboratoře. Acidobazickou rovnováhu jsme určovali analyzátozem BMS 2 MK firmy Radiometr (Dánsko) metodou podle Astrupa aj. (1960). Vzorky krve pro biochemickou analýzu odebrané do skleněných zkumavek byly zcentrifugovány a krevní sérum uskladněno při teplotě -20°C až do vlastního vyšetření. Po rozmrazení jsme v krevním séru stanovovali anorganické látky (vápník, fosfor, hořčík a chloridy), celkovou bílkovinu, močovinu, kreatinin, glukózu, cholesterol a bilirubin, aktivitu alkalické a kyselé fosfatázy, aspartátaminotransferázy, gamaglutamyltransferázy a laktátdehydrogenázy pomocí fotometru Spekol za použití příslušných Bio-La-testů (Lachema Brno). Ze stanovených koncentrací a aktivit jsme vypočítali průměrné hodnoty a směrodatné odchylky pro jednotlivé soubory krav a statistické hodnocení jsme provedli Studentovým *t*-testem podle programu STAT PLUS (VÚVeL Brno).

VÝSLEDKY

Šetření o acidobazickém stavu před a po porodu krav bez retence a s retencí sekundin jsou shrnuty do

tab. I. Z ní je zřejmé, že hodnoty pH krve vykazovaly relativně značnou stabilitu, nicméně je zřetelná tendence ke zvýšení v poporodním období u krav jak bez retence sekundin tak i s retencí sekundin. V tomto období byla také zjištěna nejvyšší průměrná hodnota u krav s retencí sekundin k 50. dni *post partum* ($7,44 \pm 0,03$) a rozdíl je statisticky významný až vysoce významný ve srovnání s kravami bez retence tak i při srovnávání hodnot ostatních časových období odběru ($P < 0,05$ – $0,01$). Další srovnání průměrných hodnot pH u krav s retencí a bez retence ukázalo, že nejsou rozdíly statisticky významné ($P > 0,1$). Hodnoty pH v den porodu byly u obou skupin krav statisticky významně vyšší ve srovnání s kravami 245–260 a 276–285 dní březosti ($P < 0,01$).

Parciální tlak CO_2 (pCO_2) se v podstatě měnil v nepřímé závislosti k hodnotám pH. U krav s retencí sekundin byl před porodem vesměs nižší než u krav bez retence. Nejnižší hodnoty pCO_2 byly většinou zjištěny v den porodu ($5,64 \pm 0,43$ a $5,46 \pm 0,38$ kPa) a rozdíly ve srovnání s hodnotami většiny ostatních skupin jsou statisticky vysoce významné ($P < 0,01$). V poporodním období je pak zřetelná tendence k mírnému zvyšování hodnot pCO_2 u obou skupin krav.

Změny aktuálního kyselého výlučku (ABE) v krvi vysokobřezých krav byly převážně nižší u krav s následnou retencí sekundin. Zřetelné zvýšení bylo zaznamenáno u obou skupin v poporodním období (až $5,20 \pm 2,11$ mmol/l u krav bez retence k 20. dni p. p. a ke stejnému dni $4,99 \pm 1,94$ u krav s retencí sekundin).

Průměrné hodnoty koncentrace standardního bikarbonátu (SBC) byly relativně velmi stabilní a rozdíly nejsou statisticky významné ani se zřetelem na různá období před a po porodu, respektive zda došlo nebo nedošlo k retenci sekundin. Nicméně souhrnně lze konstatovat, že hodnoty SBC měly určitou tendenci ke zvýšení v poporodním období.

Tab. II ukazuje výsledky šetření o obsahu vybraných minerálů a celkové bílkoviny v krevním séru krav bez retence a s retencí sekundin v peripartálním období. Při zřetelném poklesu Ca ke dni porodu ($2,27 \pm 0,40$ mmol/l, resp. $1,95 \pm 0,19$ mmol/l) zjištěné rozdíly nebyly statisticky významné ($P > 0,1$). Nicméně hladina Ca v den porodu byla statisticky významně nižší ve srovnání s obsahem v termínech sledovaného poporodního období ($P < 0,05$). Se zřetelem na obsah hořčíku byly zjištěny relativně málo rozdílné poměry, i když z nich vyplývá určitý trend k poklesu hlavně v předporodním období. Rozdíly však nejsou statisticky významné ($P > 0,1$). Hladiny fosforu jsou srovnatelné u krav s retencí a bez retence sekundin, i když v den porodu u krav se zadrženým lůžkem byla zjištěna hodnota nejnížší ($1,87 \pm 0,26$ mmol/l), rozdíly vesměs nejsou statisticky významné ($P > 0,1$).

Pokud se týká chloridových iontů mohli jsme konstatovat s postupující březostí snižování jejich koncentrace, které s určitým kolísáním přetrvávalo i v době *post partum*. U krav se zadrženým lůžkem byly po porodu koncentrace chloridů od 10. dne p. p. významně

nižší než v předcházejícím období ($P < 0,05$). Obsah celkové bílkoviny u krav před porodem měl zřetelně klesající tendenci k termínu porodu, avšak rozdíly mezi kravami s retencí a bez retence sekundin nebyly statisticky významné ($P > 0,1$) i když byl zjištěn vysoce významný rozdíl mezi hodnotami 245–260 dní a. p. a ke dni porodu ($P < 0,01$).

Výsledky šetření o energetickém a bílkovinném metabolismu jsou souborně uvedeny v tab. III. Koncentrace močoviny k termínu porodu se u obou skupin a zvláště u krav bez retence sekundin, statisticky významně až vysoce významně snižovala ($P < 0,05$ – $0,01$). U krav s retencí sekundin pak byla vždy větší, avšak rozdíl oproti kravám bez retence sekundin nebyl statisticky významný ($P > 0,1$).

Hladina kreatininu u krav před porodem měla vyloženě klesající tendenci a nejnižší hladiny byly zjištěny v den porodu ($132,9 \pm 15,4 \mu\text{mol/l}$ versus $106,5 \pm 20,2 \mu\text{mol/l}$) a zjištěné rozdíly s předporodním obdobím jsou statisticky významné ($P < 0,01$). U krav s retencí sekundin byly zjištěny výrazně vyšší koncentrace v období 276.–285. den gravidity a rozdíl se skupinou bez retence ($175,2 \pm 16,3 \mu\text{mol/l}$ versus $153,6 \pm 35,9 \mu\text{mol/l}$) je statisticky vysoce významný ($P < 0,01$). V poporodním období byly zjišťovány hladiny vesměs nižší a rozdíly mezi kravami bez retence a s retencí sekundin byly statisticky významné ($P < 0,05$).

Koncentrace glukózy vykazovala u krav bez retence sekundin opačný trend než u krav s retencí. Zatím co v první jmenované skupině před porodem a za porodu byly koncentrace vyšší, v poporodním období byly vyšší naopak u krav s retencí sekundin. Rozdíly pak byly 245–260 dní ve srovnání k 276–285 dní před porodem většinou statisticky vysoce významné ($P < 0,01$), po porodu ve srovnání ke dni porodu statisticky významné ($P < 0,05$).

Koncentrace cholesterolu u krav s retencí sekundin se s blížícím porodem statisticky významně snižovala (v době 276.–285. den březosti a v den porodu je $P < 0,05$). Rovněž v poporodním období u krav s retencí sekundin byly koncentrace cholesterolu vesměs nižší a kromě období 2–5 dní po porodu byly rozdíly většinou statisticky významné ($P < 0,05$).

Koncentrace bilirubinu u krav s retencí sekundin v době před i po porodu byly vždy vyšší, přičemž v obou skupinách při kolísání hlavně v době před porodem jsme zjišťovali u krav bez retence určitou tendenci ke zvýšení a naopak v době po porodu ke snížení. V termínech 245.–260. a 276.–285. den březosti byly rozdíly statisticky vysoce významné ($P < 0,01$).

Poměry v hladinách sledovaných enzymů v krevním séru krav bez retence a s retencí sekundin v peripartálním období ukazuje tab. IV.

Hladina alkalické fosfatázy (ALP) u krav s retencí před porodem vykazovala určitou tendenci ke snížení, v době před porodem i po porodu byla zjišťována poměrně široká variabilita (22–70 %), přičemž rozdíly mezi některými termíny odběru krve byly až statisticky významné ($P < 0,05$).

Obdobný trend byl zaznamenán v aktivitě kyselé fosfatázy (ACP) a variační koeficient v jednotlivých podskupinách činil 30–90 %. U krav s retencí sekundin byly zjišťovány v době před porodem hladiny významně vyšší s výraznou tendencí ke snížení k blížícímu se porodu, které ještě pokračovalo v době 10–30 dní *post partum*. U krav bez retence sekundin byl pokles hladiny ACP v poporodním období rovněž variabilní avšak celkově výraznější ve srovnání s hodnotami naměřenými v den porodu.

Aktivita aspartátaminotransferázy (AST) u krav před porodem měla v obou skupinách krav tendenci s blížícím porodem se zvyšovat (u krav s následně zadržným lůžkem výrazněji) a rozdíly v době 276.–285. den březosti statisticky významné ($P < 0,05$). V poporodním období při určité variabilitě hlavně u krav se zadržným lůžkem byla výrazná tendence ke snížení AST (ke 30. a 50. dni a. p. až na $0,39 \pm 0,06 \mu\text{kat/l}$ a $0,35 \pm 0,04 \mu\text{kat/l}$).

Zjištěné hodnoty gamaglutamyltransferázy (GMT) vesměs překračovaly horní hranici referenční hodnoty ($0,58 \mu\text{kat/l}$), nicméně nepoukazují na výraznější rozdíly mezi kravami bez retence a s retencí sekundin, respektive na rozdíly mezi jednotlivými termíny před a po porodu.

Aktivita laktátdehydrogenázy (LD) kolísala v obou skupinách a nejvyšší rozdíly byly zjištěny se stoupající březostí a v době porodu ($6,94 \pm 0,94$ – $8,05 \pm 1,70$: $8,02 \pm 2,12$ – $8,82 \pm 0,71 \mu\text{kat/l}$ u krav bez retence a s retencí sekundin) a rozdíly byly statisticky významné ($P < 0,05$). V poporodním období se aktivita LD u krav s retencí sekundin ve srovnání se dnem porodu statisticky významně snížila ($P < 0,01$).

DISKUSE

Již v literárním přehledu jsme uvedli, že do polyfaktorálního kauzálního komplexu vzniku retence sekundin u skotu jsou zařazovány kvantitativní a kvalitativní nutriční nedostatky a poruchy výměny látek. Současně jsme však zdůraznili, že jen malá pozornost byla dosud věnována vztahu mezi retencí sekundin a konkrétní acidobazickou rovnováhou a metabolickým profilem v peripartálním období. Právě tyto otázky byly předmětem studia v této práci.

Na základě hodnocení našich výsledků můžeme konstatovat, že jsou určité tendence a odlišnosti v dynamice změn sledovaných ukazatelů, ty však vykazují značnou variabilitu, zdaleka nemají jednoznačný charakter a průkaznost, respektive se vesměs pohybují v rozpětí šíře referenčních hodnot jak je pro acidobazickou rovnováhu uvádí Jagoš aj. (1985). Zvýšení hodnoty pH a naopak nejnižší hodnoty pCO_2 jakož i zvýšení aktuální *base exces* (ABE) při prakticky se neměnicí průměrné koncentraci standardního biokarbonátu (SBC) nasvědčují, že u krav k porodu dochází ke vzniku respirační alkalózy, nicméně tento trend byl stejný jak u krav bez zadržného lůžka, tak i se zadr-

I. Acidobazický stav před a po porodu krav bez retence a s retencí sekundin – Acid-base balance before parturition and after it in the cows without afterbirth retention and with afterbirth retention

		Délka gravidity (dny) ¹			Den porodu ²	Po porodu (dny) ³				
		245–260	261–275	276–285		2–5	10	20	30	50
Bez retence sekundin ⁴	počet krav ⁶	84	86	72	17	16	17	11	11	13
	pH	7,38 ± 0,03	7,40 ± 0,05	7,37 ± 0,07	7,41 ± 0,03	7,40 ± 0,02	7,41 ± 0,02	7,42 ± 0,03	7,42 ± 0,03	7,41 ± 0,03
	pCO ₂ (kPa)	6,08 ± 0,54	5,88 ± 0,69	6,15 ± 1,08	5,64 ± 0,43	5,39 ± 0,59	5,89 ± 0,41	6,03 ± 0,33	6,04 ± 0,51	5,83 ± 0,46
	ABE (mmol/l)	1,83 ± 2,05	1,76 ± 1,63	1,44 ± 2,89	2,59 ± 2,23	0,98 ± 1,71	3,48 ± 2,12	5,20 ± 2,11	4,47 ± 1,49	3,63 ± 2,81
	SBC (mmol/l)	25,05 ± 1,86	25,22 ± 1,44	24,79 ± 2,57	25,85 ± 2,04	24,67 ± 1,50	26,69 ± 1,87	28,10 ± 1,96	27,35 ± 1,50	27,36 ± 2,81
S retencí sekundin ⁵	počet krav ⁶	5	5	4	14	17	18	18	16	16
	pH	7,39 ± 0,01	7,38 ± 0,03	7,38 ± 0,03	7,41 ± 0,03	7,40 ± 0,03	7,41 ± 0,02	7,42 ± 0,02	7,40 ± 0,03	7,44 ± 0,03
	pCO ₂ (kPa)	5,84 ± 0,58	5,77 ± 0,81	5,43 ± 0,66	5,46 ± 0,38	5,62 ± 0,80	5,80 ± 0,52	6,14 ± 0,57	6,33 ± 0,57	5,75 ± 0,59
	ABE (mmol/l)	1,08 ± 1,56	1,90 ± 0,84	0,95 ± 0,77	2,44 ± 1,83	1,99 ± 1,98	3,78 ± 2,21	4,99 ± 1,94	4,10 ± 1,67	4,90 ± 2,40
	SBC (mmol/l)	25,18 ± 1,47	26,10 ± 1,18	25,27 ± 0,79	25,58 ± 1,58	25,20 ± 1,82	27,05 ± 1,97	28,12 ± 1,73	27,14 ± 1,50	28,00 ± 2,21

¹pregnancy length (days), ²day of parturition, ³after parturition (days), ⁴without afterbirth retention, ⁵with afterbirth retention, ⁶number of cows

II. Koncentrace vybraných minerálů a celkové bílkoviny v krevním séru krav bez retence a s retencí sekundin v peripartálním období – Concentrations of some minerals and total protein in the blood plasma of cows without afterbirth retention and with it in the peripartal period

		Délka gravidity (dny) ¹			Den porodu ²	Po porodu (dny) ³				
		245–260	261–275	276–285		2–5	10	20	30	50
Bez retence sekundin ⁴	počet krav ⁶	84	86	72	17	16	17	11	11	13
	Ca (mmol/l)	2,66 ± 0,39	2,50 ± 0,45	2,53 ± 0,39	2,27 ± 0,40	2,25 ± 0,30	2,43 ± 0,47	2,51 ± 0,41	2,28 ± 0,26	2,27 ± 0,24
	Mg (mmol/l)	0,91 ± 0,10	0,83 ± 0,09	0,93 ± 0,36	1,00 ± 0,19	0,87 ± 0,17	0,85 ± 0,15	0,95 ± 0,18	1,11 ± 0,14	1,15 ± 0,17
	P (mmol/l)	2,20 ± 0,33	2,19 ± 0,23	1,75 ± 0,42	2,04 ± 0,30	1,81 ± 0,38	1,94 ± 0,30	2,11 ± 0,44	2,19 ± 0,37	2,17 ± 0,40
	Cl (mmol/l)	92,65 ± 7,34	88,36 ± 22,65	80,37 ± 8,06	87,64 ± 12,1	86,94 ± 12,3	83,00 ± 13,97	81,50 ± 7,36	80,85 ± 8,30	83,07 ± 7,92
	Celkové bílkoviny ⁷ (g/l)	77,04 ± 7,74	77,54 ± 51,2	73,80 ± 11,5	62,48 ± 10,07	64,69 ± 9,74	71,73 ± 10,5	70,90 ± 5,30	73,00 ± 6,91	74,61 ± 11,33
S retencí sekundin ⁵	počet krav ⁶	5	5	4	14	17	18	18	16	16
	Ca (mmol/l)	2,48 ± 0,36	2,78 ± 0,36	2,46 ± 0,33	1,95 ± 0,19	2,38 ± 0,39	2,33 ± 0,43	2,46 ± 0,39	2,39 ± 0,38	2,38 ± 0,37
	Mg (mmol/l)	0,98 ± 0,11	0,88 ± 0,08	0,75 ± 0,05	0,89 ± 0,07	0,87 ± 0,16	0,76 ± 0,12	0,91 ± 0,14	0,97 ± 0,21	1,06 ± 0,18
	P (mmol/l)	2,25 ± 0,22	2,05 ± 0,18	2,48 ± 0,34	1,87 ± 0,26	1,99 ± 0,48	1,96 ± 0,34	2,08 ± 0,27	2,12 ± 0,35	2,06 ± 0,46
	Cl (mmol/l)	97,80 ± 5,06	84,20 ± 11,4	89,00 ± 19,82	86,50 ± 6,12	87,76 ± 18,2	81,30 ± 10,5	81,81 ± 6,49	82,89 ± 7,65	80,27 ± 10,67
	Celkové bílkoviny (g/l)	73,00 ± 10,79	71,60 ± 7,09	74,75 ± 14,2	67,15 ± 6,64	65,31 ± 10,10	67,64 ± 11,5	74,92 ± 9,47	73,78 ± 6,71	71,86 ± 8,60

For 1–6 see Tab. I, ⁷total protein

III. Koncentrace vybraných biochemických ukazatelů v krevním séru krav bez retence a s retencí sekund v peripartálním období – Concentrations of some biochemical indicators in the blood serum of cows without afterbirth retention and with afterbirth retention in the peripartal period

			Délka gravidity (dny) ¹			Den porodu ²	Po porodu (dny) ³				
			245–260	261–275	276–285		2–5	10	20	30	50
Bez retence sekund ⁴	počet krav ⁶		84	86	72	17	16	17	11	11	13
	močovina ⁷ (mmol/l)		4,42 ± 0,88	4,23 ± 1,27	4,34 ± 0,76	3,84 ± 0,91	4,66 ± 1,64	4,72 ± 2,91	4,46 ± 1,86	3,95 ± 1,51	4,23 ± 1,64
	kreatinin ⁸ (μmol/l)		164,5 ± 17,8	152,6 ± 16,2	153,6 ± 35,9	132,9 ± 15,4	132,1 ± 23,0	118,7 ± 17,4	106,1 ± 14,6	110,1 ± 17,1	110,5 ± 16,6
	glukóza ⁹ (mmol/l)		3,73 ± 0,38	3,48 ± 0,45	3,43 ± 0,62	3,58 ± 0,61	3,03 ± 1,02	2,28 ± 0,91	2,63 ± 0,93	2,55 ± 1,09	2,87 ± 1,07
	cholesterol ¹⁰ (mmol/l)		2,95 ± 0,40	3,00 ± 0,84	3,31 ± 0,88	3,34 ± 0,90	2,78 ± 0,84	4,02 ± 2,62	3,63 ± 1,26	4,37 ± 1,62	4,15 ± 1,45
S retencí sekund ⁵	bilirubin ¹¹ (mmol/l)		5,63 ± 12,1	7,18 ± 2,08	7,12 ± 2,67	7,90 ± 3,28	7,53 ± 4,75	5,07 ± 2,74	3,92 ± 1,32	4,75 ± 1,71	4,15 ± 1,45
	počet krav ⁶		5	5	4	14	17	18	18	16	16
	močovina (mmol/l)		5,04 ± 0,84	4,74 ± 1,45	4,70 ± 0,48	4,22 ± 1,19	4,91 ± 1,51	4,40 ± 3,08	4,92 ± 4,26	3,97 ± 1,82	4,00 ± 1,39
	kreatinin (μmol/l)		160,6 ± 5,5	158,4 ± 10,9	175,2 ± 16,3	106,5 ± 20,2	141,9 ± 20,3	108,3 ± 16,8	105,2 ± 14,6	109,6 ± 18,2	106,3 ± 11,4
	glukóza (mmol/l)		3,42 ± 0,21	3,41 ± 0,21	3,16 ± 0,32	3,11 ± 0,33	3,53 ± 1,43	2,83 ± 0,56	2,57 ± 0,57	2,84 ± 0,74	3,10 ± 0,81
	cholesterol (mmol/l)		3,02 ± 0,61	3,00 ± 0,79	2,52 ± 0,72	2,10 ± 0,32	2,96 ± 1,49	3,50 ± 2,00	3,49 ± 2,14	4,04 ± 1,25	3,42 ± 0,60
	bilirubin (mmol/l)		11,30 ± 4,62	7,92 ± 3,33	10,22 ± 2,34	8,05 ± 3,38	10,95 ± 6,05	5,56 ± 3,33	5,15 ± 3,24	4,86 ± 1,73	4,92 ± 0,86

For 1–6 see Tab. I, ⁷urea, ⁸creatinine, ⁹glucose, ¹⁰cholesterol, ¹¹bilirubin

IV. Hladiny aktivit vybraných enzymů v krevním séru krav bez retence a s retencí sekund v peripartálním období – The levels of the activities of some enzymes in the blood serum of cows without afterbirth retention and with it in the peripartal period

			Délka gravidity (dny) ¹			Den porodu ²	Po porodu (dny) ³				
			245–260	261–275	276–285		2–5	10	20	30	50
Bez retence sekund ⁴	počet krav ⁶		84	86	72	17	16	17	11	11	13
	ALP (μkat/l)		0,82 ± 0,31	0,63 ± 0,24	0,91 ± 0,42	1,00 ± 0,32	0,74 ± 0,28	0,76 ± 0,18	0,84 ± 0,34	0,82 ± 0,18	0,75 ± 0,16
	ACP (μkat/l)		94,37 ± 87,19	61,04 ± 43,59	86,79 ± 54,16	77,94 ± 38,40	56,37 ± 34,91	55,88 ± 51,81	62,14 ± 34,33	42,25 ± 30,13	54,78 ± 31,15
	AST (μkat/l)		0,35 ± 0,07	0,37 ± 0,08	0,38 ± 0,07	0,42 ± 0,07	0,50 ± 0,14	0,51 ± 0,03	0,49 ± 0,15	0,41 ± 0,10	0,44 ± 0,13
	GMT (μkat/l)		0,73 ± 0,23	0,69 ± 0,24	0,78 ± 0,27	0,70 ± 0,32	0,84 ± 0,48	0,65 ± 0,25	0,64 ± 0,19	0,69 ± 0,22	0,63 ± 0,19
S retencí sekund ⁵	LD (μkat/l)		7,30 ± 0,94	6,94 ± 0,94	7,01 ± 1,00	8,05 ± 1,70	7,77 ± 2,09	7,40 ± 1,68	8,39 ± 1,33	7,83 ± 1,83	7,95 ± 1,83
	počet krav ⁶		5	5	4	14	17	18	18	16	16
	ALP (μkat/l)		0,83 ± 0,11	0,73 ± 0,34	0,76 ± 0,22	0,63 ± 0,30	0,90 ± 0,35	0,82 ± 0,23	1,01 ± 0,42	0,93 ± 0,42	1,01 ± 0,70
	ACP (μkat/l)		126,0 ± 59,6	110,2 ± 52,3	88,7 ± 29,9	67,4 ± 23,7	68,4 ± 44,2	54,7 ± 45,6	54,2 ± 41,4	60,3 ± 36,9	67,2 ± 25,9
	AST (μkat/l)		0,37 ± 0,07	0,40 ± 0,14	0,55 ± 0,16	0,51 ± 0,05	0,46 ± 0,10	0,48 ± 0,10	0,43 ± 0,08	0,39 ± 0,06	0,35 ± 0,04
	GMT (μkat/l)		0,63 ± 0,07	0,65 ± 0,14	0,72 ± 0,20	0,67 ± 0,13	0,71 ± 0,22	0,69 ± 0,19	0,61 ± 0,17	0,65 ± 0,15	0,62 ± 0,11
	LD (μkat/l)		7,25 ± 0,78	8,02 ± 2,12	8,05 ± 2,17	8,82 ± 0,71	7,65 ± 1,02	7,82 ± 1,19	7,75 ± 1,29	7,47 ± 1,12	6,84 ± 1,33

For 1–6 see Tab. I

ženým lůžkem. V poporodním období zjištěný pohyb ukazatelů acidobazické rovnováhy u krav bez retence a s retencí sekundin je rovněž nejednoznačný a hodnoty se navzájem příliš neliší (kromě pH k 50. dni *p. p.*). Obdobný charakter změn v acidobazické rovnováze jsme na našem pracovišti zjišťovali již dříve (Kudláč, 1988; Doležel, 1989).

Naměřené koncentrace sledovaných minerálních látek se rovněž pohybují v rámci referenčních hodnot. Pokles vápníku v den porodu na minimum byl zjišťován v obou skupinách krav a je nesporně v úzké souvislosti s nastupující laktací. Naměřené hodnoty jsou pak v plném souladu s údaji, které uveřejnili Shukl aj. (1983), Jaskowski a Lechowski (1985), Sakour (1992) a jimi citovaní autoři. Určitý pokles sledovaných minerálů a chloridů v krevním séru krav v poporodním období může být důsledkem jejich výsoce zvýšeného přechodu do mléka nebo v souvislosti se změnami jejich obsahu ve stěně děložní a lochiální jak je uvádějí Boitor aj. (1986) nebo Doležel (1989).

Změny v obsahu celkové bílkoviny měly velmi podobný charakter u krav bez retence i s retencí sekundin a v podstatě se ztotožňují s údaji autorů Benýška a Kudláč (1971), Lebeda (1985) a Doležel (1989).

Hodnoty ukazatelů bílkovinného metabolismu ke konci březosti byly zjišťovány většinou vyšší, i když ne vždy statisticky výsoce významně, u krav se zadrženým lůžkem. Tuto skutečnost lze považovat za kauzální souvislost s přetrváváním bílkovin ke konci březosti a faktor zvyšující frekvenci zadrženého lůžka v souladu s údaji autorů Lotthammer (1983), Bílek (1987), Petac (1985) a jiných.

Podobně lze hodnotit i nález statisticky významně nižších hodnot glukózy u krav ke konci březosti, u nichž došlo následně k zadržení lůžka. Nálež je v souladu s obecnými údaji o vzniku retence sekundin v souvislosti s úzkým glycidoproteinovým poměrem.

Narůstající hodnoty v hladinách cholesterolu v období před porodem u krav bez zadrženého lůžka a naopak určitý pokles u krav se zadrženým lůžkem mohou souviset s měnicími se hladinami progesteronu před porodem. Jeho zvyšování v poporodním období odpovídá stabilizující se inkreci steroidních hormonů v souvislosti s obnovením ovariálního cyklu *post partum*. Naše nálezy jsou pak v souladu s údaji autorů Kimur aj. (1986), Boitor aj. (1986), Huszenica aj. (1988) a Doležel (1989).

Výrazně vyšší hladiny bilirubinu hlavně v předporodním období (v termínu 245–260 a 276–285 dní březosti $P < 0,01$) jsou v souladu se shora uváděnými vztahy zvýšeného zatížení jater přívodem bílkovin a vznikem retence sekundin.

I když aktivity vybraných enzymů v krevním séru krav bez retence a s retencí sekundin nevybočují z rámce referenčních hodnot, které uvádějí Jagoš aj. (1985), hladiny hlavně aspartátaminotransferázy a gamaglutamyltransferázy a nepřímo i kyselý fosfatázy

a laktátdehydrogenázy u krav se zadrženým lůžkem mohou poukazovat na příčinnou souvislost. Zvýšení hladin sledovaných enzymů v krvi krav s retencí sekundin uvádějí také Lotthammer (1983), Dutta a Dugwekar (1982), Boitor aj. (1986) a nejnověji obdobné údaje uvádějí Khan aj. (1995) ve vztahu k retenci sekundin u buvolice.

Souborné hodnocení našich šetření ukazuje, že je úzký vztah mezi parametry hlavně energetického a bílkovinného metabolismu a vznikem retence sekundin. nesporně však látkový metabolismus a jeho poruchy nejsou jedinými kauzálními faktory a spíše lze očekávat jejich spolupůsobení v rámci velmi pestrého a neobvyklé širokého příčinného komplexu. Stejný vztah je třeba akceptovat mezi zátěží jater nadměrným přívodem bílkovin a energetickým hladověním, které kliniky mohou vést až ke ketózám. Nesporně lze očekávat, že tyto vztahy by byly ještě výraznější při experimentálních krmných dávkách způsobujících vyložené metabolické poruchy, hlavně typu ketóz, respektive kdy toxicky působící metabolity nepříznivě ovlivňují fetomaternální spojení ještě za březosti nebo poškozují fyziologické mechanismy odpovědné za odloučení lůžka za porodu.

LITERATURA

- ARTHUR, G. H. – NOAKES, D. E. – PEARSON, H.: Veterinary Reproduction and Obstetrics. 6th ed. London, Bailliere Tindall 1989.
- ASTRUP, P. et al.: The acid base metabolism. A new approach. *Lancet*, 1, 1960: 1035–1039.
- BENÝŠEK, V. – KUDLÁČ, E.: The red blood picture in cows in the last month of pregnancy during parturition and in the period of puerperium. *Acta Vet. (Brno)*, 40, 1971: 177–185.
- BÍLEK, F.: Frekvence výskytu retencí sekundin u krav a jejich další plodnost. [Atestační práce.] Brno 1987. – Vysoká škola veterinární.
- BOITOR, I. – KADAR, L. – GHITULESCU, C. – RADULESCU, E.: Biochemische und histochemische Aspekte des Uterus beim Rind unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. *Tierärztl. Umsch.*, 41, 1986: 493–497.
- DOLEŽEL, R.: Dynamika změn vybraných ukazatelů fyziologie puerperia na pohlavním ústrojí a v periferní krvi krav. [Dizertační práce.] Brno 1989. – Vysoká škola veterinární.
- DUTTA, J. C. – DUGWEKAR, Y. G.: Serum alkaline phosphatase and lactic dehydrogenase activity on cows with retained fetal membranes. *Theriogenology*, 18, 1982: 423–427.
- GRUNERT, E.: Ätiologie, Pathogenese und Therapie der Nachgeburtsverhaltung beim Rind. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, 70, 1983: 230–235.
- GRUNERT, E.: Etiology and Pathogenesis of Retained Bovine Placenta. In: MORROW, D. A.: Current Therapy in Theriogenology. Philadelphia, London, 1986: 237–241.
- GRUNERT, E.: Nachgeburtsverhaltung beim Rind. In: Ref. Symp. für Veterinärmediziner über die Reproduktion. September 1993, Bremen.

- HARAZSTI, J. – HUSZENICA, G. – MOLNÁR, L. – SOLTI, L. – CZERNUS, V.: Postpartal ovarian activity of healthy cows and those affected by subclinical metabolic disorders. *Anim. Reprod. Sci.*, 9, 1985: 125–136.
- HEUWIESER, W.: Zur Pathogenese der Nachgeburtshaltung. *Prakt. Tierarzt.* 68, 1987: 39–42.
- HUSZENICA, G. – HARAZSTI, J. – MOLNÁR, L. – SOLTI, L. – FEKETE, S. – EKES, K. – YARD, A. C.: Some metabolic characteristics of dairy cows with different *post partum* ovarian function. *J. Vet. Med.*, 35, 1988: 506–515.
- JAGOŠ, P. a kol.: Diagnostika, terapie a prevence nemocí skotu. Praha, SZN 1985.
- JASKOWSKI, M. J. – LECHOWSKI, A.: Zależność pomiędzy zaburzeniami poporodowymi u krów a zawartością elementów mineralnych w surowicy krwi podczas okresu okołoporodowego. *Med. Weter.*, 41, 1985: 292–295.
- JOOSTEN, J. – HENSEN, E. J.: Retained placenta: an immunological approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 28, 1992: 451–461.
- KHAN, E. H. – KHAN, Z. M. – AKIJERA, P. A.: Comparative studies on serum enzymes, glucose and proteins in buffaloes with and without retention of placenta. *Acta Vet. (Brno)*, 1995
- KIMURA, Y.: Reproductive performance and blood components in postpartum dairy cows. *Jap. J. Vet. Sci.*, 39, 1986: 294–295.
- KRAJNÍČKOVÁ, M. – BEKEOVÁ, E. – MARÁČEK, I. – HENDRICHOVSKÁ, V.: Vybrané ukazatele minerálního profilu krve séra oviec v jednotlivých fázách reprodukčního cyklu. *Živoč. Výr.*, 38, 1993: 717–724.
- KUDLÁČ, E. – ELEČKO, J.: Veterinární porodnictví a gynekologie. Praha, SZN 1987.
- KUDLÁČ, E.: Fyziologie a patologie puerperia a ovlivňování reprodukčních funkcí v postpartálním období u krav a prasnic. [Doktorská dizertace.] Brno 1988. – Vysoká škola veterinární.
- KUDLÁČ, E.: Terapie a medikamentózní prevence retence sekundin u skotu. *Veterinářství*, 44, 1994: 1–5.
- LOTTHAMMER, K. H.: Vergleichende Untersuchung über den Verlauf der Gehalte an Mineralstoffen, Stoffwechselmetaboliten, Enzymen und Hormonen im Blutserum ante partum bei Milchkühen mit und ohne spätere Retentio secundinarum. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 90, 1983: 427–433.
- LEBEDA, M.: Současné problémy výživy vysoceproduktivních dojnic. *Veterinářství*, 35, 1985: 488–490.
- MORROW, D. A.: Current therapy in theriogenology. Vol. 2. Philadelphia, W. B. Saunders 1986.
- PETAC, D.: Untersuchungen zur Aufklärung des Lösungsmechanismus der Plazenta beim Rind. *Tierärztl. Umsch.*, 40, 1985: 220–226.
- SAKOUR, M.: Retence sekundin a další plodnost u krav. [Kandidátská dizertace.] Brno 1992. – Vysoká škola veterinární.
- SHUKLA, S. P. – KHARE, K. G. – PAREKH, H. K. B.: Calcium and phosphorus in relation to retained placenta in cross-bred cows. *Indian Vet.*, 60, 1983: 183–188.

Došlo 9. 1. 1995

Kontaktní adresa:

Prof. MVDr. Eduard Kudláč, DrSc., Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika
Tel. 05/41 32 11 07, fax 05/41 21 11 51

INZERCE

Redakce časopisu nabízí tuzemským i zahraničním firmám možnost inzerce na stránkách časopisu VETERINÁRNÍ MEDICÍNA. Prostřednictvím inzerátů uveřejňovaných v našem časopise budou o Vašich výrobcích informováni pracovníci z výzkumu a provozu u nás i v zahraničí.

Bližší informace získáte na adrese:

Redakce časopisu VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
k rukám ing. Z. Radošové
Ústav zemědělských a potravinářských informací

ADVERTISEMENT

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

For more detailed information, please contact:

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
attn. ing. Zdeňka Radošová
Ústav zemědělských a potravinářských informací

EFFICACY OF MOXIDECTIN INJECTABLE (CYDECTIN INJ.) AGAINST MIXED *PSOROPTES OVIS* AND *SARCOPTES OVIS* MANGE IN SHEEP

ÚČINNOST' MOXIDECTINU (CYDECTIN INJ.) NA ZMIEŠANÚ INFEKCIU SVRABOVCAMI *PSOROPTES OVIS* A *SARCOPTES OVIS* U OVIEC*

J. Čorba¹, J. Praslička¹, M. Várady¹, O. Tomašovičová¹, G. Gašparík²

¹Parasitological Institute of Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

²District Veterinary Administration, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Field efficacy of moxidectin injectable was evaluated in sheep naturally infected with both *Psoroptes ovis* and *Sarcoptes ovis* mange. Three groups of fifteen ewes were selected from the flock based on parasitological and clinical status. Group 1 remained as untreated controls. Group 2 animals received a subcutaneous injection of moxidectin at 0.2 mg/kg body weight on Day 0. Group 3 animals received 0.2 mg/kg moxidectin twice on Day 0 and Day 7. Efficacy was assessed by taking skin scrapings from each animal on Days -4, 0, 7, 14, 28 and 35 post treatment (P.T.) and counting viable mite stages and species. In both treated groups the signs of itching disappeared within seven days P.T. Rapid clinical improvement was associated with reduction in numbers of mites compared with initial score which was over 90 %. However, in skin scrapings on Day 7 P.T. several live mites of both species were present. The second injection of moxidectin removed all living mites and skin scrapings from group 3 animals that were negative for all mites on days 14, 28 and 35. The weight gain on average in group 2 was 2.0 kg and in group 3 2.7 kg, during the 35 days of trial. Untreated control animals have lost on average 3.1 kg from the weight at start of trial. All untreated animals remained positive and suffered from intensive scratching, anorexia and moist active skin lesions. Therefore they were given an emergency moxidectin treatment on days 35 and 37 each animal receiving 0.2 mg/kg b.w., subcutaneously. Moxidectin in both tested doses was well tolerated and no local reaction on injection sites was observed.

ewes; *Psoroptes ovis*; *Sarcoptes ovis*; moxidectin

ABSTRAKT: Účinnosť moxidectinu (Cydectin inj. 1%, Cyanamid, USA) sme študovali v experimente na 45 bahniciach prirodzene infikovaných svrabovcami *Psoroptes ovis* a *Sarcoptes ovis*. Zvieratá sme selektovali na základe parazitologického a klinického vyšetrenia zo stáda 500 chorých oviec. Druhej skupine pätnástich bahníc sme aplikovali jednorazovo po 0,2 mg/kg moxidectinu subkutánne. Tretia skupina pätnástich zvierat bola liečená opakovaně v 0. a 7. deň rovnakými dávkami moxidectinu. Prvá skupina pätnástich bahníc bola neliečená kontrola. Efektívnosť terapie sme overovali nálezom svrabovcov v kožných zoškraboch odobratých individuálne od jednotlivých zvierat v intervaloch -4, 0, 7, 14, 28 a 35 dní. V oboch liečených skupinách bahníc vymizlo svrbenie v priebehu siedmich dní. U týchto zvierat sme pozorovali aj výrazné zlepšenie klinického stavu ochorenia. Účinnosť jednorazovej aplikácie 0,2 mg/kg ž. h. moxidectinu bola po siedmich dňoch od terapie vyše 90%, ale v niektorých kožných vzorkách sme nachádzali živé roztoče. Opakovaná aplikácia moxidectinu v 7-dňovom intervale usmrtila všetky roztoče (účinnosť 100 %). Priemerné hmotnostné prírastky počas 35-dňového pokusu boli v druhej skupine 2,0 kg na bahnicu, v tretej skupine 2,7 kg na bahnicu, kým neliečené zvieratá v priemere stratili po 3,1 kg na bahnicu z hmotnosti zo začiatku sledovania. Moxidectin v oboch skúšaných dávkach bol dobre tolerovaný a nepozorovali sme lokálne reakcie na mieste aplikácie.

bahnice; *Psoroptes ovis*; *Sarcoptes ovis*; moxidectin

ÚVOD

Moxidectin je antiparazitikum druhej generácie. Patrí medzi makrocyclické laktóny a je produkovaný kombináciou fermentácie a chemickej syntézy z nemadectinu, ktorý produkuje plesne *Streptomyces cyanogriseus* non-cya-

nogenus. Moxidectin má mimoriadne široké spektrum účinnosti na endoparazity (nematódy) aj na ektoparazity. Jeho účinnosť na gastrointestinálne a pľúcne nematódy u oviec sme opísali nedávno (Čorba a i., 1994).

Úlohou nášho terajšieho experimentu bolo študovať účinnosť injekčnej liekovej formy moxidectinu a bah-

* Výsledky uverejnenej práce boli dosiahnuté pri riešení projektu GAV 2/1363/94.

níc prirodzene infikovaných svrabovcami *Psoroptes ovis* a *Sarcoptes ovis*.

MATERIÁL A METÓDY

Zvieratá

Experiment sme urobili v mesiacoch marec–máj 1994 na poľnohospodárskom podniku, kde problémy so svrabovitosťou oviec, najmä v zimnom období, pretrvávali už niekoľko rokov. Zo stáda 500 chorých zvierat sme do pokusu vybrali 45 bahníc s najvýraznejšími klinickými príznakmi ochorenia. Zvieratá sme rozdelili do troch skupín po 15 jedincov a ustajnil ich tak, že nebol možný kontakt medzi skupinami počas celého experimentu.

Parazitologické vyšetrenia

Od každej bahnice sme v intervaloch –4, 0, 7, 14, 28 a 35 dní odobrali ostrým skalpelom vzorky kože z piatich vopred určených predilekčných miest (koreň chvosta, chrbát, krk, hlava, brucho). Odobraté vzorky od každého zvieratá boli osobitne uložené do očíslovaných Petriho misiek, v ktorých bol kúsok vlhkej vaty. Vzorky boli držané pri teplote +4 °C až do vyšetrenia, ktoré sa uskutočnilo do 48 hodín po ich odobratí. Používali sme metódu, ktorú publikoval Maloney (1982) modifikovanú tým, že vzorky boli rozrušené v ultrazvukovom prístroji (Dynatech) preto, aby sa uvoľnili všetky roztoče z materiálu. Nájdene parazity sme počítali a identifikovali pod mikroskopom pri 100-násobnom zväčšení.

Terapia

Prvej skupine 15 bahníc sme aplikovali jednorazovo po 0,2 mg/kg moxidectinu (Cydectin inj. 1 %) v 0. deň. Druhej skupine bahníc sme aplikovali rovnakú dávku moxidectinu opakovane v dňoch 0. a 7 deň. Prípravok sme aplikovali subkutánne na vnútornú stranu stehna, kým zvieratá boli fixované v sediacej polohe. Všetky bahnice sme individuálne odvážili na začiatku a na konci experimentu.

Klinické hodnotenie

Rozsah a intenzita kožných lézií sme zaznamenávali individuálne v týždenných intervaloch. Na začiatku pokusu u každej bahnice bolo chorobou postihnutých viac ako 50 % povrchu tela (Guillot, 1981).

Hodnotenie účinnosti

Počet a druh živých roztočov sme určovali individuálne pre každé zviera v každom odberovom dni. Účinnosť moxidectinu sme vypočítali na základe redukcie počtov živých svrabovcov podľa vzorca

$$\% \text{ účinnosti} = \frac{G. P. \text{ kontroly} - G. P. \text{ liečenej}}{G. P. \text{ kontroly}} \cdot 100$$

Geometrický priemer (G.P.) bol vypočítaný transformovaním počtov na prirodzený log (počet + 1). Efektívnosť terapie sme stanovili na každý odberový deň.

VÝSLEDKY

Účinnosť na *Psoroptes ovis*

Jednorazová aplikácia 0,2 mg/kg moxidectinu mala účinnosť 90,2 % v skupine I a v skupine II 81,1 % na 7. deň po terapii (tab. I). U oboch liečených skupín v tomto intervale bolo pozitívnych po päť vzoriek z pätnástich.

Po 14 dňoch od terapie sa účinnosť jednorazovej aplikácie moxidectinu zvýšila na 99,3 % a len v troch z pätnástich vyšetrených vzoriek sme našli živé roztoče (1, 1 a 2 exempláre). Podobnú účinnosť sme zisťovali aj na konci pokusu.

Opakovaná aplikácia 0,2 mg/kg moxidectinu mala 100% účinok už na 14. deň, keď v žiadnej z vyšetrených vzoriek sme nenašli živé svrabovce až do konca pokusu.

Účinnosť na *Sarcoptes ovis*

Jednorazová aplikácia 0,2 mg/kg moxidectinu mala 90,1% účinnosť v skupine I a 82,4% v skupine II (tab. II). V tejto skupine prežila časť roztočov terapiu, lebo na 35. deň od aplikácie bolo z 15 vyšetrených vzoriek pozitívnych sedem. Druhá aplikácia moxidectinu usmrtila všetky svrabovce, keď všetky vyšetrené vzorky boli negatívne až do konca pokusu.

Klinické príznaky

U liečených zvierat sme pozorovali signifikantné zlepšenie zdravotného stavu. Zvieratá sa prestali otierať o okolité predmety, boli kľudné a prijímali potravu. Na postihnutých miestach sme pozorovali postupné odpaďovanie chrást, hojenie sa jaziev, zníženú citlivosť a zvýšenú elasticitu kože a pomalé narastanie vlny. U neliečených zvierat sa zdravotný stav prudko zhoršil a vyvinula sa u nich rozsiahla pyodermatitída. Zvieratá neprijímali potravu a polihovali. Z tejto skupiny zvierat v priebehu 35 dní uhynuli tri bahnice. Preto sme zostávajúcim zvieratám aplikovali dvakrát v intervale 48 h po 0,2 mg/kg moxidectinu. Ich klinický stav sa po terapii postupne zlepšoval.

Hmotnostné prírastky

U neliečených zvierat sme zistili v priemere o 3,1 kg nižšiu hmotnosť ako na začiatku pokusu. U liečených bahníc sme za 35-dňové obdobie zistili hmotnostné prírastky v priemere o 2,0 a 2,7 kg na bahnicu.

I. Účinnosť moxidectinu (Cydectin inj.) proti *Psoroptes ovis* u oviec – Efficacy of moxidectin (Cydectin inj.) against *Psoroptes ovis* in sheep

Skupina ¹	Počet živých svrabovcov v dňoch po liečbe ²						
	-4.	0.	7.	14.	21.	28.	35.
Neliečená kontrola ³ G.M. ± S.D.	23,4 ± 25,5	20,5 ± 31,9	23,9 ± 25,2	30,8 ± 18,8	29,3 ± 13,5	15,8 ± 9,8	14,8 ± 15,9
Moxidectin 0,2 mg/kg – 0. deň ⁴ G.M. ± S.D.	21,7 ± 17,2	22,5 ± 18,4	2,3 ± 4,7	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,7	0,4 ± 1,8
Moxidectin 0,2 mg/kg – 0. a 7. deň ⁵ G.M. ± S.D.	27,4 ± 29,4	19,9 ± 16,9	2,1 ± 3,7	0	0	0	0

G.M. = geometrický priemer – geometric mean

S.D. = štandardná odchýlka – standard deviation

¹group, ²number of living mites in days after treatments, ³untreated control, ⁴day 0, ⁵day 0 and 7

II. Účinnosť moxidectinu (Cydectin inj.) proti *Sarcoptes ovis* u oviec – Efficacy of moxidectin (Cydectin inj.) against *Sarcoptes ovis* in sheep

Skupina ¹	Počet živých svrabovcov v dňoch po liečbe ²						
	-4.	0.	7.	14.	21.	28.	35.
Neliečená kontrola ³ G.M. ± S.D.	18,9 ± 8,3	21,7 ± 12,3	18,4 ± 15,4	24,9 ± 13,1	26,9 ± 8,9	19,1 ± 7,7	13,5 ± 7,3
Moxidectin 0,2 mg/kg – 0. deň ⁴ G.M. ± S.D.	25,7 ± 15,4	24,7 ± 16,4	1,8 ± 3,2	1,7 ± 3,1	0,6 ± 1,3	0,8 ± 1,68	1,8 ± 3,5
Moxidectin 0,2 mg/kg – 0. a 7. deň ⁵ G.M. ± S.D.	24,1 ± 18,1	22,4 ± 15,2	3,3 ± 4,7	0,1 ± 0,5	0	0	0

G.M. = geometrický priemer – geometric mean

S.D. = štandardná odchýlka – standard deviation

For 1–5 see Tab. I

DISKUSIA

Prvé správy publikovali o účinnosti moxidectinu na svrabovce čeľade *Psoroptidae* u hovädzieho dobytku Lonneux a Losson (1992) a Losson a Lenneux (1993), ktorí zistili rovnakú účinnosť subkutánnej aplikácie 0,2 mg/kg a 0,5 mg/kg pour-on formulácie moxidectinu. Mathes a i. (1993) experimentálne infikovali teľatá roztočmi *Sarcoptes ovis* a zistili, že moxidectin v dávke 0,2 mg/kg a 0,4 mg/kg aplikovaný subkutánne a v dávke 0,5 mg/kg aplikovaný povrchovo vo forme pour-on vyliečili pokusné zvieratá v priebehu šiestich dní.

Naše poznatky o účinnosti moxidectinu proti svrabovcom *Psoroptes ovis* a *Sarcoptes ovis* u oviec sú prioritné. Poukazujú na to, že kým na roztoče čeľade *Psoroptidae* je účinná aj jednorazová podkožná aplikácia 0,2 mg/kg moxidectinu, táto dávka a počet aplikácií neusmrť všetky svrabovce *Sarcoptes ovis*, keď efektívnosť bola len 86,4 až 97,7 %. Preto pre efektívnu terapiu svrabovitosti u oviec doporučujeme dvojrazovú aplikáciu 0,2 mg/kg moxidectinu opakovanú v intervale siedmich dní. Táto schéma terapie okrem usmrtenia všetkých vývojových štádií roztočov mala priaznivý vplyv aj na klinický priebeh ochorenia.

LITERATÚRA

- ČORBA, J. – KRUPICER, I. – VÁRADY, M.: Efficacy of moxidectin against gastro-intestinal and lungworms in naturally infected sheep. *Biopharm.* 4, 1994: 21–25.
- GUILLLOT, F. S.: Population increase of *Psoroptes ovis* in stanchioned cattle during summer. *J. Med. Ent.*, 18, 1981: 44–47.
- LONNEUX, J. F. – LOSSON, B.: Field efficacy of injectable and pour-on moxidectin in cattle naturally infested with *Psoroptes ovis* (Acarina: *Psoroptidae*). *Vet. Parasit.*, 45, 1992: 147–152.
- LOSSON, B. J. – LONNEUX, J. F.: Field efficacy of moxidectin 0.5% pour-against *Chorioptes bovis*, *Damalia bovis*, *Lignonathus vituli* and *Psoroptes ovis* naturally infested cattle. In: 14th Int. Conf. of W.A.A.V.P. Understanding and control of parasitic diseases of animal, August 8–13, 1993, Cambridge, U.K., 1993: 61.
- MATTHES, H. F. – BUSCH, A. – DRÖBIGK, V. – HIEPE, Th.: Efficacy of moxidectin against *Sarcoptes bovis* in experimentally infected calves. In: 14th Int. Conf. of W.A.A.V.P. Understanding and control of parasitic diseases of animal, August 8–13, 1993, Cambridge, U.K., 1993: 264.
- MELENEY, V. P.: Control of psoroptic scabies on calves with ivermectin. *Amer. Vet. Res.*, 43, 1982: 229–231.

Došlo 2. 2. 1995

Kontaktná adresa:

Doc. MVDr. Július Čorba, DrSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/344 55, fax 095/314 14, e-mail: corba@cscun.tuke.sk

ÚSTŘEDNÍ ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ KNIHOVNA, PRAHA 2, SLEZSKÁ 7

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna v Praze (dále jen ÚZLK), která je jednou z největších zemědělských knihoven na světě, byla založena v roce 1926. Již od počátku šlo o knihovnu veřejnou. Knihovna v současné době obsahuje více než jeden milion svazků knih, cestovních zpráv, dizertací, literatury FAO, svázaných ročníků časopisů z oblasti zemědělství, lesnictví, veterinární medicíny, ekologie a dalších oborů. V letošním roce knihovna odebírá 750 titulů domácích a zahraničních časopisů. Informační prameny získané do fondu jsou v ÚZLK zpracovávány do systému katalogů – je budován jmenný katalog a předmětový katalog jako základní katalogy knihovny a dále různé speciální katalogy a kartotéky. Počátkem roku 1994 přistoupila ÚZLK k automatizovanému zpracování knihovního fondu v systému CDS/ISIS.

Pro informaci uživatelů o nových informačních pramenech ve fondech ÚZLK zpracovává a vydává knihovna následující publikace: Přehled novinek ve fondu ÚZLK, Seznam časopisů objednaných ÚZLK, Přehled rešerší a tematických bibliografií z oboru zemědělství, lesnictví a potravinářství, AGROFIRM – zpravodaj o přírůstcích firemní literatury (je distribuován na disketách).

V oblasti mezinárodní výměny publikací knihovna spolupracuje s 1 200 partnery ze 60 zemí světa. Knihovna je členem IAALD – mezinárodní asociace zemědělských knihovníků. Od září 1991 je členem mezinárodní sítě zemědělských knihoven AGLINET a od 1. 1. 1994 je depozitní knihovnou materiálů FAO pro Českou republiku.

Knihovna poskytuje svým uživatelům následující služby:

Výpůjční služby

Výpůjční služby jsou poskytovány všem uživatelům po zaplacení ročního registračního poplatku. Mimopražští uživatelé mohou využít možností meziknihovní výpůjční služby. Vzácné publikace a časopisy se však půjčují pouze prezenčně.

Reprografické služby

Knihovna zabezpečuje pro své uživatele zhotovování kopií obsahů časopisů a následné kopie vybraných článků. Na počkání jsou zhotovovány kopie na přání uživatelů. Pro pražské a mimopražské uživatele jsou zabezpečovány tzv. individuální reproslužby.

Služby z automatizovaného systému firemní literatury

Jsou poskytovány z databáze firemní literatury, která obsahuje téměř 13 000 záznamů 1 700 firem.

Referenční služby

Knihovna poskytuje referenční služby vlastních databází knižních novinek, odebíraných časopisů, rešerší a tematických bibliografií, vědeckotechnických akcí, firemní literatury, videotéky, dále z databází převzatých – Celostátní evidence zahraničních časopisů, bibliografických databází CAB a Current Contents. Cílem je podat informace nejen o informačních pramenech ve fondech ÚZLK, ale i jiné informace zájímavé zemědělskou veřejnost.

Půjčování videokazet

V AGROVIDEU ÚZLK jsou k dispozici videokazety s tematikou zemědělství, ochrany životního prostředí a příbuzných oborů. Videokazety zasílá AGROVIDEO mimopražským zájemcům poštou.

Uživatelům knihovny slouží dvě studovny – všeobecná studovna a studovna časopisů. Obě studovny jsou vybaveny příručkovou literaturou. Čtenáři zde mají volný přístup k novinkám přírůstků knihovního fondu ÚZLK.

Adresa knihovny:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna
Slezská 7
120 56 Praha 2

Výpůjční doba:

pondělí, úterý, čtvrtek:	9.00–16.30
středa	9.00–18.00
pátek	9.00–13.00

Telefonické informace:

vedoucí:	25 23 92
referenční služby:	25 90 96, 25 75 41/linka 520
časopisy:	25 32 25
výpůjční služby:	25 75 41/linka 415
meziknihovní výpůjční služby:	25 75 41/linka 304
Fax:	25 70 90
E-mail:	IHOCH@uzpi.agric.cz

RESULTS OF SURGICAL TREATMENT OF THE THORACOLUMBAR DISC DISEASE IN THE DOG

VÝSLEDKY CHIRURGICKÉ LÉČBY ONEMOCNĚNÍ TORAKOLUMBÁLNÍCH DISKŮ U PSŮ

A. Nečas

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: The clinical records of 90 dogs with thoracolumbar disc disease treated by fenestration or decompressive surgery on Surgical Department of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno between September 1992 and March 1994 were reviewed. The breed, age and sex predisposition, rate of disc protrusion or extrusion and number of multiple disc extrusions were recorded. The frequency of disc protrusion/extrusion at each intervertebral space in thoracolumbar region of spine was also observed. Dogs were grouped by clinical signs of disease in four groups. Recovery rates depending on the pre-operative neurological grade of spinal injury and duration of clinical signs were compared. Patients were observed at least 6 months after surgery and the results of therapy were classified as good (complete recovery of motor and urinary function), fair (some remaining dysfunction, either motor or urinary, but animal retained independent function and usefulness) and poor (not enough improvement to be returned to the owner as an independent animal). Eight breeds and mixed-breed dogs were represented in the 90 cases of thoracolumbar disc disease. Shorthaired Dachshunds predominated (58.9%). The age range of dogs was 3–12 years; 52% were males and 48% females. Incidence of disc protrusion was 13.3% and disc extrusion 86.6% of the cases, with the frequency 3.3% of multiple disc extrusions. The most common site of lesion was the T12–T13 interspace. Twelve dogs in group II were treated by fenestration with good results of therapy in all cases. There was no recurrence of clinical signs during period of observation. Hemilaminectomy (without concomitant disc fenestration) was performed in six dogs in group III and sixty-six dogs in group IV A. Recovery rate in group III cases was 100%. In the group IV A, when decompression was performed during 48 hours, there were recorded good results in 83.3%, fair in 6.7% and poor in 10% of the cases. Recurrence rate in this group was 1.5%. A hemilaminectomy and durotomy were performed in six dogs with severe neurological dysfunction (group IV B) during 48 hours. Outcome of the surgery was poor in all six cases.

dog; disc; protrusion; extrusion; hemilaminectomy; fenestration

ABSTRAKT: V souboru 90 psů byl sledován výskyt protruze nebo extruze torakolumbálních meziobratlových plotének v souvislosti s plemennou příslušností, věkem a pohlavím pacientů. Operace se uskutečnily v době od září 1992 do března 1994 na klinice chirurgie a ortopedie Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně. Byla sledována rovněž frekvence výskytu protruze (13,3 %) a extruze (86,6 %) torakolumbálních disků, frekvence postižení jednotlivých disků v torakolumbálním úseku páteře a četnost případů, kdy vyhézlo více disků současně (3,3 %). Úspěšnost dekompresní hemilaminektomie (bez fenestrace okolních meziobratlových plotének) a prognóza závisely na stupni postižení a na době trvání příznaků před chirurgickým zákrokem. U paraplegických psů se zachovalou hlubokou bolestivostí (stupeň IV A), operovaných do 48 hodin, byl výsledek operace výborný u 83,3 %, dobrý u 6,7 % a špatný u 10 % případů. Pacienti byli po dobu minimálně šesti měsíců po operaci opakovaně neurologicky vyšetřováni, přičemž byla vyhodnocena návratnost paraparézy nebo paraplegie po provedené hemilaminektomii.

pes; disk; protruze; extruze; hemilaminektomie; fenestrace

ÚVOD

Léze torakolumbálních disků u psů představují 84–86 % problémů s meziobratlovými ploténkami (Tombs a Bauer, 1993). Neurologické příznaky, spojené s lézemi torakolumbálních disků, se liší v závislosti na anatomické lokalizaci, době trvání a dyna-

mické síle komprese. Nejčastější je bolestivost zad, paraparéza bez schopnosti chůze a hyperreflexie pánevních končetin. Příznaky na pánevních končetinách bývají často bilaterálně symetrické, i když se může objevit jejich lateralizace. Nejzávažnějším stupněm postižení je paraplegie. U psů s paraparézou bez schopnosti chůze nebo paraplegií je běžné porušení funkce močového měchýře (Oliver, 1987).

Stupeň – Grade	Klinické projevy – Clinical signs	Volba terapie – Therapy chosen
I	první epizoda bolesti zad a žádný neurologický deficit – first episode of pain in the back and no neurologic deficit	M nebo F
II	opakující se bolestivost a/nebo lehká paraparéza – recurrent pain and/or mild paraparesis	M, F, D, D + F
III	střední a těžká paraparéza – medium and heavy paraparesis	D nebo D + F
IV	paraplegie – paraplegia	
	A se zachovalou hlubokou bolestivostí – with remaining deep pains	D nebo D + F
	B hluboká bolestivost chybí < 48 hodin – deep pain is absent < 48 hours	D + d

Vysvětlivky – Explanatory notes:

M = medikamentózní terapie – medicamentous therapy, F = fenestrace disku – disc fenestration, D = dekompresní operace s odstraněním vyhrýzých mas – decompressive surgery with removal of prolapsed masses, d – durotomie – durotomy

Psy s lézemi torakolumbálních disků je možno z hlediska stanovení postupu terapie rozdělit (Tombs a Bauer, 1993) do čtyř základních skupin (tab. I).

MATERIÁL A METODA

V době od září 1992 do března 1994 bylo na klinice chirurgie a ortopedie VFU v Brně operováno celkem 90 psů s onemocněním torakolumbálních meziobratlových plotének.

Pacienti byli na základě klinického nálezu zařazeni do jednoho ze čtyř stupňů, které uvádí tab. I.

Diagnostika vycházela vždy z národní, anamnézy neurologického vyšetření a lokalizace léze (Oliver a Lorenz, 1993). Byla potvrzena nativním rtg snímkem, nebo myelografickým vyšetřením (Iopamiro) v laterolaterální, ventrodorzální, případně šikmé projekci. Před operací byly pacientům intravenózně aplikovány kortikosteroidy (dexametazon 2 mg/kg). Rentgenologické vyšetření a vlastní operační zákrok jsme prováděli v celkové inhalační anestézii. Po premedikaci atropinem (0,05 mg/kg i. m.) a sedaci xylazinem (2 mg/kg i. m.) byl pomalu i. v. aplikován 1% roztok ketaminu (2 mg/kg). Po endotracheální intubaci a připojení k narkotizačnímu přístroji jsme udržovali anestézii směsí kyslíku, oxidu dusného a halotanu v zavěšeném dvojecestném systému. V případě potřeby jsme použili řízenou ventilaci.

Z 90 pacientů s onemocněním torakolumbálních meziobratlových plotének jsme u 12 z nich, se stupněm postižení II (tab. I), provedli fenestraci disků metodou separace dorzolaterálních svalů a u 78 psů, se stupněm postižení III, IV A, IV B (tab. I), jsme jako metodu dekomprese použili hemilaminektomii bez současné fenestrace okolních disků.

Pooperační péče spočívala v intramuskulární aplikaci kortikosteroidů v průběhu dvou dnů po operaci (dexametazon 0,2 mg/kg dvakrát denně) a vitamínů skupiny B. Současně bylo monitorováno močení. V případě retence moče jsme tři- až čtyřikrát denně manuálně ne-

bo katetrizací vyprazdňovali močový měchýř a při infekci močového ústrojí jsme podávali antibiotika. Operované psy jsme z důvodu prevence vzniku dekubitů umístili na měkkém a suchém lůžku. Velmi důležitou součástí pooperační péče byla rehabilitační cvičení (pasivní pohyby pánevních končetin v plném rozsahu pohyblivosti kloubů, masáže svalů pánevních končetin, chůze s oporou atd.). Za tři až deset dnů jsme pacienty propouštěli do domácího ošetřování, přičemž v provádění rehabilitace – chůze s dopomocí, masáže svalů pánevních končetin, plavání (Gödde a Jaggy, 1993), pokračovali majitelé. Kožní stehy jsme vyjímali za 10–12 dnů po operaci.

Pacienty jsme znovu neurologicky vyšetřovali za tři až šest týdnů a poté za šest měsíců po operaci. Dříve operované případy byly sledovány i déle než šest měsíců. Výsledek zákroku byl hodnocen při kompletním obnovení motorických funkcí a činnosti močového ústrojí jako výborný, při určitém motorickém deficitu nebo močové dysfunkci jako dobrý a pokud nedošlo k obnově motorických funkcí a činnosti močového ústrojí jako špatný – zvíře nebylo schopno samostatného, na pomoci majitele nezávislého života.

VÝSLEDKY

Z hlediska zastoupení plemen v námi sledovaném souboru bylo protruzí a extruzí torakolumbálních disků postiženo 53 (58,9 %) krátkosrstých, šest (6,7 %) dlouhosrstých a sedm (7,8 %) hrubosrstých jezevčků, 11 (12,2 %) kříženců, sedm (7,8 %) pekinézů, tři (3,3 %) francouzští buldoči, jeden (1,1 %) americký kokršpaněl, jeden (1,1 %) střední knírač a jeden (1,1 %) srněc ratlík.

Věk pacientů se pohyboval v rozmezí tří až 12 let. V souboru pacientů bylo 52 % samčího a 48 % samičího pohlaví.

Z 90 operovaných případů se u 12 psů (13,3 %) jednalo o protruzi a u 78 psů (86,6 %) o extruzi disku, přičemž ve třech případech (3,3 %) došlo k extruzi dvou disků současně.

Nejčastěji postižen byl disk v meziobratlovém prostoru T12–T13 (38,7 %), následovaly disky T11–T12 (32,3 %), T13–L1 (17,2 %), T10–T11 (5,4 %), L1–L2 (5,4 %) a L2–L3 (1 %).

Samotnou fenestraci (metodou separace dorzolatálních svalů) bylo z celkového počtu 90 psů s lézí v torakolumbálním úseku páteře ošetřeno 12. Jednalo se o pacienty se stupněm postižení II, s příznaky lehké paraparezy a bolestivosti zad trvajících pět až 14 dnů. U všech 12 psů ošetřených fenestrací, došlo k úplnému uzdravení v průběhu dvou až šesti týdnů po operaci. U žádného z nich nedošlo dosud k recidivě.

Hemilaminektomie byla jako metoda chirurgické léčby použita celkem u 78 psů (86,7 %). Z toho šest psů (7,7 %) vykazovalo klinické příznaky stupně III, 66 psů (84,6 %) patřilo klinicky do stupně IV A a šest psů (7,7 %) do stupně IV B.

U všech šesti pacientů stupně III, u kterých doba příznaků před operací byla dva až tři týdny, byl výsledek hemilaminektomie výborný. K obnově motorických funkcí došlo v průběhu tří až devíti týdnů.

Výsledky ošetření hemilaminektomií bez fenestrace okolních torakolumbálních disků u pacientů se stupněm IV A jsou v tab. II.

Z tab. II je zřejmé, že do 48 hodin po vzniku paraplegie bylo z celkového počtu 66 psů se stupněm IV A operováno 30 psů (45,5 %). Ze souboru těchto 30 psů lze přitom hodnotit výsledek chirurgického zákroku jako výborný u 25 psů (83,3 %), jako dobrý u dvou psů (6,7 %) a špatný u tří psů (10 %). To znamená, že 90 % (27 psů) bylo po operaci, provedené do 48 hodin po vzniku příznaků, schopno chodit.

Z 21 psů operovaných třetí až čtvrtý den po vzniku příznaků byl u osmi (38,1 %) hodnocen výsledek operace jako výborný, u osmi (38,1 %) jako dobrý a u pěti (23,8 %) jako špatný. Po operaci bylo tedy schopno chůze 16 psů (76,2 %).

Z 15 psů, u kterých paraplegie trvala pět až 10 dnů, jsme zaznamenali výborný výsledek operace u dvou psů (13,3 %), dobrý výsledek u čtyř (26,7 %) a špatný u devíti psů (60 %). Schopno chůze tedy bylo jen 40 % psů. Z devíti případů se špatným výsledkem čtyřikrát po operaci uhynuli (selhání ledvin).

Na přání majitele bylo rovněž operováno šest psů, zařazených podle klinického vyšetření do stupně IV B (psi paraplegičtí se ztrátou hluboké bolestivosti), u kterých příznaky netrvaly déle než 48 hodin. Ve všech případech byl výsledek operace špatný (z toho v pěti případech byla po durotomii zjištěna myelomalacie).

K recidivě paraplegie (stupeň IV A) došlo pouze v jednom případě všech operovaných torakolumbálních disků (1,5 %), a to za čtyři měsíce po úspěšné operaci první extruze. Pacient se i po opakované operaci (hemilaminektomie) plně zotavil.

DISKUSE

Incidence onemocnění z hlediska plemene, věku a pohlaví a pravděpodobnost výhřezu více disků současně se nijak výrazně neliší od literárních údajů (Hoerlein, 1971).

Stejně tak frekvence postižení jednotlivých torakolumbálních disků je podobná (Walker a Betts, 1985) s tím, že nejčastěji bývá postižen disk v meziobratlovém prostoru T12–T13.

Na nejvhodnější terapii jednotlivých stadií onemocnění torakolumbálních disků, existují dosud rozdílné názory. U psů s první epizodou bolestivosti zad a žádnými neurologickými deficity (stupeň I) je úspěšná konzervativní (medikamentózní) terapie. Běžná je až 48% návratnost těchto stavů (Funkquist, 1978) s tím, že příznaky jsou při opakujících se epizodách často závažnější. U psů s klinickými projevy stupně II jsme v případech, kdy se klinický stav pacienta v průběhu prvních čtyř dnů konzervativní léčby nelepšil, prováděli samotnou fenestraci bez dekomprese. U žádného z takto dosud ošetřených pacientů nedošlo, po námi sledované období, k recidivě.

Včasná a správná indikace daného chirurgického zákroku je vedle neurologického vyšetření a lokalizace léze nejdůležitější součástí úspěšného ošetření pacienta s onemocněním meziobratlových plotének. To dokazuje i stoprocentní úspěšnost po provedení hemilaminektomie u pacientů se stupněm postižení III. Zvláště u pacientů paraplegických při extruzi torakolumbálních

II. Výsledky po provedení hemilaminektomie v torakolumbálním úseku páteře u psů se stupněm postižení IV A – The results of hemilaminectomy in the thoracolumbar region of the spinal cord in dogs with IV A affection

	Doba trvání paraplegie před operací (dny) ¹									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Počet pacientů ²	14	16	9	12	2	1	9	–	1	2
Celkem ³	30		21		15					
Z toho výsledek po operaci ⁴										
výborný ⁵	13	12	5	3	1	–	–	–	–	1
dobrý ⁶	–	2	3	5	–	–	4	–	–	–
špatný ⁷	1	2	1	4	1	1	5	–	1	1

¹paraplegia duration before intervention (days), ²number of patients, ³total, ⁴out of this: result after intervention, ⁵good, ⁶fair, ⁷poor

disků (stupeň IV A a IV B) je důležité zahájit operaci do 48 hodin. Zachování hluboké bolestivosti pánevních končetin nebo doba trvání její absence je nejdůležitějším faktorem pro stanovení prognózy. Psi, u nichž je hluboká bolestivost po extruzi torakolumbálního disku zachována, obvykle dobře odpovídají na dekompresní operaci. Tento fakt potvrzují i naše klinické zkušenosti (výborný výsledek u 83,3 % a dobrý u 6,7 % psů skupiny IV A, kteří byli přivedeni k operaci do 48 hodin). Úspěšnost našich operací se přibližuje výsledkům uváděným uznávanými autory, jako je Lineberger a Kornegay (cit. Wheeler a Sharp, 1994), kteří po provedení hemilaminektomie zaznamenali u stupně IV A 90% úspěšnost, pokud přistoupili k dekompresi do 48 hodin po vzniku paraplegie. Hoerlein (cit. Walker a Betts, 1985) uvádí úplnou obnovu motorických funkcí u 87 % psů paraplegických a u 90,5 % psů paraparetických. Jako nejvhodnější metoda dekomprese v torakolumbálním úseku páteře se nám jeví hemilaminektomie. Dostatečně otevírá páteřní kanál, lze při ní šetrně odstranit ventrálně a ventrolaterálně od míchy extrudované maso disku (McKee, 1992), obratle jsou po operaci stabilnější a nevystává při ní nebezpečí fibrotizace tkání, které by působily kompresi míchy. V porovnání s laminektomií je její provedení náročnější a vyžaduje přesnou diagnostiku a lokalizaci léze. Na našem pracovišti provádíme, vzhledem k velmi nízké (1,5 %) pravděpodobnosti výhřezu dalšího disku v jiném meziobratlovém prostoru a vzhledem k množství hmot nukleu, které se při fenestraci podaří odstranit, pouze samotnou hemilaminektomii bez současné fenestrace okolních torakolumbálních disků. Prata (cit. Walker a Betts, 1985) zaznamenal recidivu po samotné laminektomii pouze u 2,7 % případů. Někteří autoři doporučují provádět hemilaminektomii současně s profylaktickou fenestrací disků (Bojrab, 1983; McKee, 1992).

Míra úspěšnosti operace 5 % se uvádí u psů paraplegických bez zachování hluboké bolestivosti (Walker a Betts, 1985). Gambardella (cit. Toombs a Bauer, 1993) uvádí 25% úspěšnost. Lineberger a Kornegay (cit. Wheeler a Sharp, 1994) zaznamenali u psů skupiny IV B, dekomprimovaných

do 48 hodin hemilaminektomií, dokonce 50% úspěšnost. V našem případě byla úspěšnost dekompresní operace nulová (v pěti případech byla peroperačně zjištěna myelomalácie). Pro stanovení prognózy u psů s dubiozní hlubokou bolestivostí doporučujeme durotomii, protože makroskopická neporušenost míchy nemůže být přesně určena bez otevření dury. V případě myelomalácie je prognóza infauštní.

LITERATURA

- BOJRAB, M. J.: Prophylactic thoracolumbar disk fenestration. In: BOJRAB, M. J.: Current techniques in small animal surgery. Philadelphia, Lea and Febiger 1983.
- FUNKQUIST, B.: Investigations of the therapeutic and prophylactic effects of disc evacuation in cases of thoracolumbar herniated discs in dogs. Acta Vet. Scand., 19, 1978: 441–457.
- GÖDDE, T. – JAGGY, A.: Thorakolumbaler Bandscheibenvorfall beim Dackel (Diagnose und Therapie). Prakt. Tierarz., 7, 1993: 653–663.
- HOERLEIN, B. F.: Intervertebral disks. In: HOERLEIN, B. F.: Canine neurology. Philadelphia, W. B. Saunders 1971.
- McKEE, W. M.: A comparison of hemilaminectomy (with concomitant disc fenestration) and dorsal laminectomy for the treatment of thoracolumbar disc protrusion in dogs. Vet. Rec., 130, 1992: 296–300.
- OLIVER, J. E.: Disorders of micturition. In: OLIVER, J. E. – HOERLEIN, B. F. – MAYHEW, I. G.: Veterinary neurology. Philadelphia, W.B. Saunders 1987.
- OLIVER, J. E. Jr. – LORENZ, M. D.: Handbook of veterinary neurology. Philadelphia, W. B. Saunders 1993.
- TOOMBS, J. P. – BAUER, M. S.: Intervertebral disk disease. In: SLATTER, D. H.: Textbook of small animal surgery. Vol. 1. Philadelphia, W. B. Saunders 1993.
- WALKER, T. L. – BETTS, C. W.: Intervertebral disk disease. In: SLATTER, D. H.: Textbook of small animal surgery. Vol. 1. Philadelphia, W. B. Saunders 1985.
- WHEELER, S. J. – SHARP, N. H. J.: Small animal spinal disorders – diagnosis and surgery. London, Mosby 1994.

Došlo 13. 2. 1995

Kontaktní adresa:

MVDr. Alois Nečas, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika
Tel. 05/41 32 11 07, fax 05/41 21 11 51

APPLICATION OF NEFERM-TEST TO IDENTIFICATION OF PSYCHROTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM MILK AND DAIRY PRODUCTS

UPLATNĚNÍ NEFERM-TESTU V IDENTIFIKACI PSYCHROTROFNÍCH BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ

Z. Páčová¹, E. Urbanová²

¹Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno, Czech Republic

²Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Sanitary and nutritive quality of foods from animal sources, that means also of milk and dairy products, are significantly influenced by the presence of psychrotrophic bacteria, the lipolytic and proteolytic activity of which contributes to their nutritive and sensory changes. This applies particularly to psychrotrophic bacteria of the genus *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Alcaligenes* and *Flavobacterium* (Muir and Phillips, 1984; Piton and Richard, 1985; Craven and Macauley, 1990). These bacteria cause raw and pasteurized milk to turn bitter and gelatinize, and/or technological problems during processing. In the present paper the possible use of NEFERM-test and numerical identification system TNW was verified for identification psychrotrophic, nonfermentative bacteria isolated from milk and dairy products. This research is a continuation of our preceding work (Urbanová and Páčová, 1995) dealing with identification of these bacteria in poultry. The test comprised 35 psychrotrophic, gram-negative, oxidase-positive, nonfermentative bacteria isolated from raw milk (30 strains) and hard cheeses (5 strains). A commercial diagnostic kit NEFERM-test (Lachema a.s., Brno) and respective conventional methods were parallelly used for identification; the conventional methods were complemented by assays of oxidase (OXI) and β -galactosidase (ONPG) using of commercial strips Lachema a.s. Additional tests were as follows: gelatin and Tween 80 hydrolysis, fluorescein production. The readings of yellow or orange pigment production were also applied. A numerical identification system TNW was used to process the results (Czech Collection of Microorganisms, Faculty of Science, Masaryk University, Brno). Correct identification of bacteria by means of commercial diagnostic kits depends particularly upon the high goodness of fit of the results obtained by conventional tests in relation to those obtained by commercial kits. Tab. I shows a comparison of the results of biochemical assays of 35 bacterial strains under investigation in NEFERM-test with the results of conventional methods. This table shows the 100% goodness of fit with conventional tests for four assays (ARG, IND, ESC, MAN). The goodness of fit ranges from 82.9 to 94.3% in the other assays. Most false reactions were determined in Simmon's citrate and nitrates (around 20%). A low percentage of coincident results was found out in some sugars (GLU, XYL) – 82.9%. The 100% goodness of fit for mannitol resulted from the fact that all the investigated strains were mannitol-negative, which is true, according to literary data (Mölin and Ternström, 1986) and our experience as well, for most fluorescent pseudomonads of animal origin. It was proved during this investigation that the results coincident with those of traditional tests could be obtained by prolonged cultivation of NEFERM-test lasting 72 hours at a room temperature (22–24 °C). Further prolongation of cultivation brings about falsely positive results. As a majority of nonfermentative, oxidase-positive bacteria isolated from foods from animal sources consists of fluorescent pseudomonads, successful identification of psychrotrophic bacteria is based on correct and expeditious determination of these pseudomonads. Using the results of NEFERM-test only, the identification numerical program identified 18 strains successfully by the species (51.4%), while 14 strains were not identified successfully by the species (40%). After inclusion of the results of three additional tests (gelatin and Tween 80 hydrolysis, fluorescein production), species identification increased to 28 strains (80%) with correct identification (Tab. II). Only 5 strains (14.3%) remained without correct species identification. These results are similar to those obtained in the preceding paper (Urbanová and Páčová, 1995). O'Hara et al. (1993), who tested four commercial diagnostic systems, report that successful identification increased after inclusion of other biochemical tests, e.g. from 77.0 to 95.6% in API system, from 76.2 to 91.3% in Cobas ID system. The use of NEFERM-test complemented by several additional tests does not solve this problem fully either, but it facilitates faster orientation particularly as for discrimination of fluorescent pseudomonads, which is problematic when other commercial kits for nonfermentative bacteria identification are used. E.g. Kitch et al. (1992) tested a four-hour diagnostic system RapID NF Plus, in which they obtained very good results (90.1% successful species identification), but after inclusion of additional tests this system did not discriminate between *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* either. Species determination of strains isolated from milk and dairy products (Tab. III) with prevailing counts of pseudomonads (51.5%) corresponds to literary data (Cox and MacRae, 1989; Craven and Macauley, 1990), but it is lower than in poultry, in which 89% of pseudomonads were identified (Urbanová and Páčová, 1995). Also Ternström et al. (1993) report on the dominant share of pseudomonads (*P. fluorescens* biovar 1, *P. fragi*, *P. lundensis* and *P. fluorescens* biovar 3) in spoilage of raw and pasteurized milk.

Yellow-pigmenting strains were also isolated from milk and dairy products which were determined to represent the genus *Flavobacterium* (22.9%) and *Brevundimonas vesicularis* – formerly *Pseudomonas vesicularis* (2.9%). Isolation of 6 strains of *Psychrobacter immobilis* (17.1%) is interesting as they were earlier identified as the genus „*Achromobacter*“ or as Moraxella-like psychrotrophic bacteria while they are often isolated from various sources such as fish, poultry and meat products (Tiwarri and Maxcy, 1972; Lahellec et al., 1975; Juni and Heym, 1986; Hudson et al., 1987). The results of this investigation have shown that it is possible to use NEFERM-test complemented with three selected additional tests for identification of psychrotrophic bacteria isolated from milk and milk products. As this is a specific group of bacteria, this fact must be taken into account not only at their cultivation and evaluation of the NEFERM-test results (cultivation – room temperature/72 hours was found to be usable) but also at their identification by means of TNW system.

psychrotrophic gramnegative nonfermentative bacteria; commercial diagnostic kit; numerical identification system

ABSTRAKT: Testováno bylo 35 gramnegativních, oxidáza pozitivních, psychrotrofních bakterií izolovaných z mléka a mléčných výrobků pomocí komerčního diagnostického setu NEFERM-test, dodatkových testů a numerického identifikačního systému TNW. Správně bylo identifikováno 80 % kmenů, nesprávně 14,3 %, neidentifikováno 5,7 %. V daném souboru se nejčastěji vyskytovaly druhy *Pseudomonas fluorescens* (25,7 %), *P. fragi* (20,0 %), *Flavobacterium indologenes* (20,0 %) a *Psychrobacter immobilis* (17,1 %).

psychrotrofní gramnegativní nefermentující bakterie; komerční diagnostický set; numerický identifikační systém

ÚVOD

Hygienickou jakost a nutriční hodnotu potravin živočišného původu, tedy i mléka a mléčných výrobků, významně ovlivňuje přítomnost psychrotrofních bakterií, které jsou schopny normálních metabolických projevů za nízkých teplot, při nichž se suroviny a potravinu uchovávají, zpracovávají, distribují a skladují. Na nutričních a senzoryckých změnách se podílí svojí lipolytickou a proteolytickou aktivitou především psychrotrofní bakterie rodů *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Alcaligenes* a *Flavobacterium* (Muir a Phillips, 1984; Piton a Richard, 1985; Craven a Macauley, 1990). Výsledkem je hořknutí a rosolovatění syrového i pasterovaného mléka, resp. technologické obtíže při jeho zpracování na mléčné výrobky. Proto jsme se zaměřili na izolaci a identifikaci psychrotrofních, nefermentujících bakterií, které jsou v této surovině nejčetnější populací psychrotrofní mikrobioty a navázali tak na předchozí práci (Urbanová a Páčová, 1995), zabývající se identifikací těchto bakterií u drůbeže.

MATERIÁL A METODY

Bylo testováno 35 psychrotrofních, gramnegativních, oxidáza pozitivních, nefermentujících bakterií izolovaných ze syrového mléka (29 kmenů) a tvrdých sýrů (šest kmenů).

Identifikace byla souběžně prováděna komerčním setem NEFERM-test (Lachema a. s., Brno), který obsahuje 12 biochemických testů: glukóza (GLU), arginin (ARG), indol (IND), eskulin (ESL), Simmons' citrát (SCI), fosfatáza (PHS), ureáza (URE), manitol (MAN), xylóza (XYL), maltóza (MAL), laktóza (LAC), nitráty (NIT) a odpovídajícími klasickými konvenčními metodami, doplněnými testem na oxidázu (OXI) a β -galak-

tosidázu (ONPG); komerční proužky Lachema a. s. Jako dodatkové testy byly provedeny: hydrolyza želatiny a Tweenu 80 (Páčová a Kocur, 1984) a produkce fluoresceinu (King aj., 1954). Odečítána byla i tvorba žlutého nebo oranžového pigmentu. Konvenční testy byly kultivovány při pokojové teplotě (22–24 °C) a odečítány po třech až čtyřech dnech, cukry po jednom až šesti dnech.

K vyhodnocení výsledků byl použit numerický identifikační systém TNW (Česká sbírka mikroorganismů, PřF MU Brno).

VÝSLEDKY

Porovnání výsledků biochemických testů 35 bakteriálních kmenů v NEFERM-testu s výsledky konvenčních metod je uvedeno v tab. I. Z ní vyplývá, že u čtyř testů (ARG, IND, ESC, MAN) se projevila 100% shoda s konvenčními testy. U ostatních testů se shoda pohybuje v rozmezí 82,9–94,3 %. Nejvíce falešných reakcí (více než 20 %) bylo získáno u Simmons' citrátu a nitrátů.

Výsledky identifikace testovaných kmenů jsou uvedeny v tab. II. Při použití pouze výsledků NEFERM-testu bylo identifikačním numerickým programem správně druhově zařazeno 18 kmenů (51,4 %), nesprávně 14 kmenů (40 %). Po doplnění výsledků tří dodatkových testů (hydrolyza želatiny a Tweenu 80, produkce fluoresceinu) se druhová identifikace podstatně zvýšila a to na 28 kmenů (80 %) správně zařazených. Nesprávně druhově zařazeno zůstalo pět kmenů (14,3 %). V tab. III je uveden přehled identifikovaných bakterií dle druhového zastoupení. Nejčastěji byly identifikovány druhy *Pseudomonas fluorescens* (25,7 %), *P. fragi* (20,0 %), *Flavobacterium indologenes* (20,0 %) a *Psychrobacter immobilis* (17,1 %).

I. Srovnání výsledků NEFERM-testu a konvenčních testů – Comparison of the results of NEFERM-test and conventional tests

Test ¹	NEFERM-test					
	shodné výsledky ²		falešně pozitivní ³		falešně negativní ⁴	
	počet ⁵	%	počet	%	počet	%
ARG	35	100,0				
IND	35	100,0				
ESC	35	100,0				
PHS	33	94,3	2	5,7		
SCI	28	80,0	5	14,3	2	5,7
URE	33	94,3	2	5,7		
NIT	27	77,1	6	17,2	2	5,7
GLU	29	82,9	2	5,7	4	11,4
XYL	29	82,9	2	5,7	4	11,4
MAN	35	100,0				
MLT	32	91,4			3	8,6
LAC	33	94,3				

¹test, ²agreement results, ³false positive, ⁴false negative, ⁵number

II. Identifikace 35 psychrotrofních bakterií numerickým systémem TNW – Identification of 35 psychrotrophic bacteria by the numerical system TNW

Identifikace ¹	NEFERM-test		NEFERM-test a dodatkové testy ⁶	
	počet ⁷	%	počet	%
Správná rodová ²	31	88,5	33	94,3
Správná druhová ³	18	51,4	28	80,0
Nesprávná druhová ⁴	14	40,0	5	14,3
Neidentifikováno ⁵	3	8,6	2	5,7

¹identification, ²genus correctly, ³species correctly, ⁴species incorrectly, ⁵nonidentified, ⁶NEFERM-test and additional tests, ⁷number

DISKUSE

V práci byla ověřena možnost využití NEFERM-testu a numerického identifikačního systému TNW k identifikaci psychrotrofních bakterií izolovaných z mléka a mléčných výrobků.

Správná identifikace bakterií pomocí komerčních setů závisí především na vysoké shodě výsledků konvenčních testů s komerčními sety. U jednotlivých testů (tab. I) jsme dosáhli obdobných výsledků jako při testování psychrotrofních bakterií izolovaných z drůbeže (Urbanová a Páčová, 1995). Nejnížší procento shodných výsledků bylo u nitrátů (22,9 % falešných reakcí). Vysoké procento falešně pozitivních reakcí (17,2 %) je možné vysvětlit tím, že došlo pravděpodobně k přidání většího množství zinku do jamky s negativními nitráty, a tím k redukci až na volný dusík, aniž by byla zachycena redukce nitrátů na nitrity. Nízké procento shodných výsledků bylo získáno i u některých cukrů (GLU, XYL). Při srovnání s konvenčními testy jsme zjistili, že se jedná o kmeny, které zkvašují cukry za dva až tři dny a v NEFERM-testu při kultivaci při

III. Druhové zastoupení v souboru 35 testovaných psychrotrofních bakterií izolovaných z mléka a sýrů – Species representation in the set of 35 tested psychrotrophic bacteria isolated from milk and cheeses

Druh ¹	Počet ²	%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9	25,7
<i>Pseudomonas fragi</i>	7	20,0
<i>Pseudomonas putida</i>	1	2,9
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	2,9
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	2,9
<i>Flavobacterium indologenes</i>	7	20,0
<i>Flavobacterium breve</i>	1	2,9
<i>Psychrobacter immobilis</i>	6	17,1
Neidentifikováno ³	2	5,6

¹species, ²number, ³nonidentified

teplotě 30 °C po dobu 48 h získáme negativní výsledek. Stoprocentní shoda u manitu byla důsledkem toho, že všechny námi studované kmeny byly manit negativní. V této práci bylo prokázáno, že shodné výsledky s konvenčními testy získáme prodloužením kultivace NEFERM-testu na 72 h při pokojové teplotě. Další prodloužení kultivace vede již k falešně pozitivním výsledkům.

Na základě našich předchozích výsledků i literárních údajů (Cox a MacRae, 1989; Venugopal, 1990; Ternström aj., 1993) je zřejmé, že podstatnou část nefermentujících, oxidáza pozitivních bakterií izolovaných z potravin živočišného původu tvoří fluorescentní pseudomonády. Jejich správná a rychlá identifikace je základem úspěšné identifikace psychrotrofních nefermentujících bakterií z mléčných výrobků a masa. Proto byly k NEFERM-testu cíleně vybrány tři dodatkové testy (hydrolýza želatiny a Tweenu 80 a produkce fluoresceinu), které zvýšily procento úspěšnosti z 51,4 u NEFERM-testu na 80,0 (tab. II). Tyto výsledky jsou obdobné jaké jsme získali v předchozí práci (Urbanová a Páčová, 1995). Rovněž O'Hara aj. (1993), kteří ověřovali čtyři komerční diagnostické systémy uvádějí, že úspěšnost identifikace se zvýšila po dodání dalších biochemických testů, např. u systému API ze 77,0 na 95,6 %, u systému Cobas ID z 76,2 na 91,3 %. Problematika rychlé identifikace nefermentujících bakterií je poměrně složitá, a proto i v zahraničí jsou ověřovány způsoby využití komerčních diagnostických setů (Nortje aj., 1990; Kitch aj., 1992). Ani použití NEFERM-testu doplněného několika dodatkovými testy tento problém zcela neřeší, ale umožňuje rychlejší orientaci zejména v odlišení fluorescentních pseudomonád, které je i u jiných komerčních setů pro nefermentující bakterie problematické. Např. Kitch aj. (1992) testovali čtyřhodinový diagnostický systém RapID NF Plus, kde získali velmi dobré výsledky (90,1 % úspěšná druhová identifikace), ale i po přidání dodatkových testů tento systém nediferencoval mezi *Pseudomonas fluorescens* a *P. putida*.

V naší práci uváděl program TNW při identifikaci fluorescenčních pseudomonád jako atypické reakce neschopnost růstu při teplotě 37 °C a využívání manitolu. Na rozdíl od fluorescenčních pseudomonád humánního původu, pro které je program TNW sestaven, jsou námi testované pseudomonády psychrotrofní, tzn., že nerostou při teplotě 37 °C a dle našich výsledků i literárních údajů (Molin a Ternström, 1986) je většina fluorescenčních pseudomonád živočišného původu mánit negativní.

Druhové zastoupení kmenů izolovaných z mléka a mléčných výrobků (tab. III) s převažujícím počtem pseudomonád (51,5 %) odpovídá literárním údajům (Cox a MacRae, 1989; Craven a Macauley, 1990), je však nižší než u drůbeže, kde jsme identifikovali 89 % pseudomonád (Urbanová a Páčová, 1995). Rovněž Ternström aj. (1993) uvádějí dominantní podíl pseudomonád (*P. fluorescens* biovar 1, *P. fragi*, *P. lundensis* a *P. fluorescens* biovar 3) na zkaze syrového a pasterovaného mléka. Proto je důležité, aby pro bezpečné skladování syrového mléka v průběhu jeho zpracování do 72 h byl původní počet psychrotrofních bakterií nižší než 2×10^3 cfu/ml.

Dále byly z mléka a mléčných výrobků izolovány žlutě pigmentující kmeny, které byly určeny jako zástupci rodu *Flavobacterium* (22,9 %) a *Brevundimonas vesicularis* – dříve *Pseudomonas vesicularis* (2,9 %). Zajímavá je izolace šesti kmenů *Psychrobacter immobilis* (17,1 %), které byly dříve zařazovány do rodu „*Achromobacter*“ nebo identifikovány jako *Moraxella-like* psychrotrofní bakterie a jsou často izolovány z různých živočišných zdrojů jako jsou ryby, drůbež a masné produkty (Tiwari a Maxcy, 1972; Lahellec aj., 1975; Juni a Heym, 1986; Hudson aj., 1987). O izolaci těchto kmenů z mléka resp. ze sýrů, ze kterých pochází naše izoláty, jsme nezjistili literární údaje.

Výsledky této práce ukázaly, že k identifikaci psychrotrofních bakterií izolovaných z mléka a mléčných výrobků lze použít NEFERM-test doplněný třemi vybranými dodatkovými testy. Jelikož se však jedná o specifickou skupinu bakterií, je nutné toto vzít v úvahu nejen při kultivaci a hodnocení výsledků NEFERM-testu (osvědčil se kultivační režim – pokojová teplota po dobu 72 h), ale i při jejich identifikaci systémem TNW.

LITERATURA

- COX, J. M. – MACRAE, I. C.: A numerical taxonomic study of proteolytic and lipolytic psychrotrophs isolated from caprine milk. *J. Appl. Bact.*, 66, 1989: 137–152.
- CRAVEN, H. M. – MACAULEY, B. J.: Psychrotrophic microorganisms in refrigerated pasteurized milk. In: Brief Com-

- munications of the XXIIIth International Dairy Congress, Montreal, October 8–12, 1990, vol. I, 1990: 119.
- HUDSON, M. J. – HOLLIS, D. G. – WEAVER, R. E. – GALVIS, C. G.: Relationship of CDC group EO-2 and *Psychrobacter immobilis*. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1987: 1907–1910.
- JUNI, E. – HEYM, G. A.: *Psychrobacter immobilis* gen. nov., sp. nov.: Genospecies composed of gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *Int. J. Syst. Bact.*, 36, 1986: 388–391.
- KING, E. O. – WARD, M. K. – RANAY, D. J.: Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44, 1954: 301.
- KITCH, T. T. – JACOBS, M. R. – APPELBAUM, P. C.: Evaluation of the 4-hour RapID NF Plus method for identification of 345 gram-negative nonfermentative rods. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 1992: 1267–1270.
- LAHELLEC, C. – MEURIER, C. – BENNEJEAN, G. – CATSARAS, M.: A study of 5920 strains of psychrotrophic bacteria isolated from chickens. *J. Appl. Bact.*, 38, 1975: 89–97.
- MOLIN, G. – TERNSTRÖM, A.: Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from spoiled meat, water, and soil. *Int. J. Syst. Bact.*, 36, 1986: 257–274.
- MUIR, D. D. – PHILLIPS, J. D.: Prediction of the shelf life of raw milk during refrigerated storage. *Milchwissenschaft*, 39, 1984: 7–11.
- NORTJE, G. L. – NEL, L. – JORDAAN, E. – BADENHORST, K. – GOEDHART, E. – HOLZAPFEL, W. H.: The aerobic psychrotrophic populations on meat and meat contact surfaces in a meat production system and on meat stored at chill temperatures. *J. Appl. Bact.*, 68, 1990: 335–344.
- O'HARA, C. M. – TENOVER, F. C. – MILLER, J. M.: Parallel comparison of accuracy of API 20E, Vitek GNI, MicroScan Walk/Away Rapid ID, and Becton Dickinson Cobas Micro ID-E/NF for identification of members of the family *Enterobacteriaceae* and common gram-negative, non-glucose-fermenting bacilli. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1993: 3165–3169.
- PÁČOVÁ, Z. – KOCUR, M.: New medium for detection of esterase and gelatinase activity. *Zbl. Bakt. Hyg., R. A.*, 258, 1984: 69–73.
- PITON, CH. – RICHARD, J.: Les *Pseudomonas psychrotrophes* du lait cru. *Sci. Aliments*, 5, 1985: 13–16.
- TERNSTRÖM, A. – LINDBERG, A. M. – MOLIN, G.: Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *J. Appl. Bact.*, 75, 1993: 25–34.
- TIWARI, N. P. – MAXCY, R. B.: *Moraxella-Acinetobacter* as contaminants of beef and occurrence in radurized product. *J. Food Sci.*, 37, 1972: 901–903.
- URBANOVÁ, E. – PÁČOVÁ, Z.: Uplatnění NEFERM-testu v identifikaci psychrotrofních bakterií izolovaných z potravin. *Vet. Med. – Czech*, 40, 1995: 151–155.
- VENUGOPAL, V.: Extracellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage: A review. *J. Food Protect.*, 53, 1990: 341–350.

Došlo 3. 2. 1995

Kontaktní adresa:

RNDr. Zdena Páčová, Česká sbírka mikroorganismů, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Tvrďého 14, 602 00 Brno, Česká republika, tel. 05/33 72 31, fax 05/41 21 12 14

THE OCCURRENCE OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN BULK MILK SAMPLES

VÝSKYT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* V BAZÉNOVÝCH VZORCÍCH MLÉKA

P. Benda, M. Vyletělová

Research Institute for Cattle Breeding, Rapotín, Czech Republic

ABSTRACT: In the years 1993–1994 the occurrence of *Staphylococcus aureus* was investigated in bulk milk samples in the area where a Baby Food Factory at Zábřeh in Moravia is located, and in Bruntál, Zlín and Polička districts. Evaluation of the results was based on ECC Directive 92/46, while the dynamics of *S. aureus* presence was followed for the whole period of observation as well as in the particular seasons. A total of 4,485 samples was processed. Out of these, 50.7% contained less than 100 CFU/ml of *S. aureus*, 41.4% contained 100–500 CFU/ml, 6.73% 500–2,000 CFU/ml and 1.14% contained more than 2,000 CFU/ml (Fig. 1). The samples were divided into three categories: private new-established farms, cooperatives and State-owned enterprises in the area of the Zábřeh Factory and others (Zlín, Bruntál and Polička districts). There were highly significant differences in the content of staphylococci ($P = 0.01\%$) between the three categories of samples. Ninety-eight percent of samples from private farms, 96% samples from the Zábřeh Factory area and 85% of the other samples comply with the regulation EEC 92/64 (Tab. I) for raw cow's milk for the manufacture of products "made with raw milk" whose manufacturing process does not involve any heat treatment (Fig. 2). The occurrence of *S. aureus* in the Zábřeh Factory area shows an expressive seasonal dynamics ($P = 0.005\%$) with maximum values in winter months (December–March) and minimum values in summer months (July–October) – Fig. 3. The same relationship can be seen on more extensive data files for the particular producers (Fig. 4). The issues related to culture media for *S. aureus*, risks of enterotoxin production and correlations with the occurrence of staphylococcus-induced mastitis in dairy cow herds are also discussed.

milk; bulk milk samples; *Staphylococcus aureus*; sanitary evaluation; seasonal dynamics

ABSTRAKT: V letech 1993–1994 jsme sledovali výskyt *S. aureus* ve směsných bazénových vzorcích mléka z oblasti závodu Kojenecké a dětské výživy (KDV) v Zábřehu na Moravě, z Bruntálska, Zlínska a okolí Poličky. Hodnocení výsledků bylo vztaženo k direktivě ECC 92/46, byla sledována také dynamika *S. aureus* v průběhu celého období i sezonní dynamika. Celkem bylo zpracováno 4 485 vzorků. Z nich 50,7 % obsahovalo méně než 100 CFU/ml *S. aureus*, 41,4 % 100–500 CFU/ml, 6,73 % 500–2 000 CFU/ml a 1,14 % obsahovalo více než 2 000 CFU/ml. Vzorky byly rozděleny do třech kategorií: soukromé, nově vznikající farmy, družstevní a státní podniky v oblasti KDV Zábřeh a ostatní (Zlínsko, Bruntálsko, Poličsko). Mezi uvedenými třemi soubory vzorků byly shledány vysoce významné rozdíly v obsahu stafylokoků ($P = 0,01\%$). 98 % vzorků ze soukromých farem, 96 % vzorků z oblasti KDV Zábřeh a 85 % z ostatních vzorků vyhovuje předpisu EEC 92/46 pro syrové kravské mléko k technologickému zpracování bez tepelného ošetření (raw cows milk for the manufacture of products „made with raw milk“ whose manufacturing process does not involve any heat treatment). Výskyt *S. aureus* v oblasti KDV Zábřeh vykazuje výraznou ($P = 0,005\%$) sezonní dynamiku s maximem v zimních měsících (prosinec až březen) a minimem v letních (červenec až říjen) měsících. Stejnou závislost lze pozorovat i v případech rozsáhlejších souborů dat pro jednotlivé dodavatele. Diskutovány jsou také problémy spojené s kultivačními médii pro *S. aureus*, riziko tvorby enterotoxinů a korelace s výskytem stafylokokových mastitid ve stádech.

mléko; bazénové vzorky; *Staphylococcus aureus*; hygienické hodnocení; sezonní dynamika

ÚVOD

Staphylococcus aureus patří k významným humánním i veterinárním patogenům. Podstatou patogenity *S. aureus* může být buď invaze do makroorganismu (sepe, abscesy, léze apod.), nebo působení produkovaných toxinů, zejména enterotoxinu. Stafylokokové enterotoxikózy patří v současné době mezi nejčastější pří-

činy alimentárních intoxikací (Gilmour a Harvey, 1990). Přestože syrové mléko jako vehikulum uvedených onemocnění již nefiguruje na předních místech (Bryan, 1983), je nutno výskytu *S. aureus* v surovině pro mlékárenské zpracování věnovat neustálou pozornost, neboť výrobky typu sýrů s nízkou dohřívanou syřeninou, málo kyselé sýry či UHT mléko jsou z hlediska stafylokokových intoxikací potenciálně rizikové

potraviny (Reiter aj., 1964; Beckers aj., 1980; Nunez aj., 1986).

V naší práci jsme sledovali výskyt *S. aureus* v bazénových vzorcích mléka. Pro tento typ vzorků pochází *S. aureus* převážně z případů klinických a subklinických stafylokokových mastitid ve stádě, s převažujícím boviním biotypem C (Řížíčková, 1991). Přes sníženou frekvenci tvorby enterotoxinů u kmenů uvedeného biotypu je *S. aureus* v syrovém mléce rizikovým kontaminantem.

Hlavním cílem naší práce pak byl úvodní screening výskytu *S. aureus* v bazénových vzorcích mléka v podmínkách naší zemědělské prvovýroby a srovnání získaných dat s normativem EEC 92/46 pro syrové kravské mléko.

MATERIÁL A METODY

V průběhu let 1993–1994 byly v oblasti závodu KDV Zábřeh pravidelně sváženy bazénové vzorky mléka. Pravidelný svoz byl v roce 1993 také organizován v oblasti Bruntálska, v okolí Zlína a na Poličsku. Kromě pravidelných svozných oblastí se v laboratoři našeho ústavu zpracovávaly také jednorázové bazénové vzorky mléka sloužící ke screeningu mastitid ve stádech. Všechny uvedené vzorky byly mimo fyzikálně chemických analýz také vyšetřovány na přítomnost *S. aureus*.

Kultivace mikroorganismů probíhala po inokulaci 0,1 ml zkoušeného vzorku na povrch Mannitol Salt Phenol-Red agaru (Merck No. 5404) 48 h při teplotě 37 °C a dále pak 24 h při teplotě 20 °C (pro lepší vývoj pigmentace kolonií). Suspektní kolonie *S. aureus* (žlutě až oranžově pigmentované, se zónou utilizace manitolu okolo kolonií) byly dále identifikovány pomocí testů na volnou i vázanou koagulázu a hemolýzu na agaru s beraní krví. Pigmentované hemolytické kmeny s pozitivní volnou i vázanou koagulázou nebyly již dále identifikovány; ve sporných případech pak k detailnějšímu za-

řazení kmenů sloužily doplňkové testy (STAPHY-test Lachema Brno). Součet kolonií všech typů, identifikovaných jako *S. aureus*, byl stanoven jako celkový počet CFU *S. aureus* v 1 ml mléka.

Výsledky byly vyhodnoceny vzhledem k direktivě ECC 92/46 (tab. I) a rozděleny do tříd podle počtu CFU *S. aureus* v 1 ml mléka. Zvlášť byly hodnoceny vzorky pocházející ze soukromých farem, dále vzorky ze svozných oblastí závodu KDV Zábřeh na Moravě, s výjimkou soukromníků, a vzorky ostatní, kam jsme zahrnuli Bruntálsko, Zlínsko a Poličsko. Spojení bylo provedeno z důvodu nižších počtů vzorků v uvedených třech oblastech. Vyhodnoceny byly jednak celkové rozdělení do uvedených tříd za celé sledované období, jednak dynamika výskytu stafylokoků v průběhu sledovaného období.

Statistické vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými podsoubory vzorků bylo vzhledem k výrazně nenormálnímu rozdělení souborů provedeno pomocí metody kontingenčních tabulek. Jednotlivé dvojice podsouborů pak byly srovnávány neparametrickým Wilcoxonovým testem.

VÝSLEDKY

Celkem bylo za uvedené období analyzováno 4 485 bazénových vzorků mléka, ve kterých byl stanoven počet *S. aureus*. Z nich v 744 případech nebyl *S. aureus* detekován, tj. počet činil méně než 10 CFU/1 ml. 1 530 vzorků se nalézalo v rozmezí 10–100 CFU/1 ml, což spolu s předchozí skupinou tvoří 50,7 % odběrů, které by vyhověly kritériím ECC pro syrové kravské mléko k přímému konzumu. V intervalu 100–500 CFU/ml jsme našli 1 858 vzorků, tj. 41,42 % celkového počtu. V rozmezí hodnot 500–2 000 CFU/ml, které již znamenají odmítnutí mléka k přímému konzumu a pouze podmíněné přijetí k technologickému zpracování, se pohybovalo 302 vzorků (6,73 %). Hygienicky zcela nevyhovující kategorii vzorků nad 2 000 CFU/ml tvořilo

I. Výťah z předpisu 92/46 EEC ze dne 12. 6. 1992 – An excerpt from Directive EEC 92/46, of 12th June 1992

Druh mléka ¹	<i>n</i>	<i>m</i>	<i>M</i>	<i>c</i>
Syrové mléko k dalšímu technologickému zpracování bez tepelného ošetření ²	5	500	2 000	2
Mléko k přímému konzumu ³	5	100	500	2

n = počet analyzovaných podjednotek pro jeden vzorek materiálu – number of analyzed subunits for a sample of milk

m = prahová hodnota počtu mikroorganismů v 1 ml; vzorek je považován za uspokojivý, nepřesahuje-li počty bakterií ve všech podjednotkách vzorku hodnotu *m* – threshold value of microorganism counts per 1 ml; the sample is considered as complying with the regulation if the bacterial counts in all subunits of sample do not exceed the value *m*

M = maximální hodnota počtu mikroorganismů v 1 ml; vzorek je považován za neuspokojivý, přesahuje-li počet bakterií v jedné či více podjednotkách vzorku hodnotu *M* – maximum value of microorganism counts per 1 ml; the sample is considered as not complying with the regulation if the bacterial counts in one or more subunits of sample exceed the value *M*

c = počet podjednotek vzorku, ve kterých počet bakterií může být mezi hodnotami *m* a *M*; vzorek je považován za ještě přijatelný, nepřesahuje-li počty bakterií ve zbývajících podjednotkách hodnotu *m* – the number of sample subunits in which the bacterial counts may range between the values *m* and *M*; the sample is still considered as acceptable if the bacterial counts in the other subunits do not exceed the value *m*

¹ sort of milk, ² raw milk for manufacturing process not involving any heat treatment, ³ milk for direct consumption

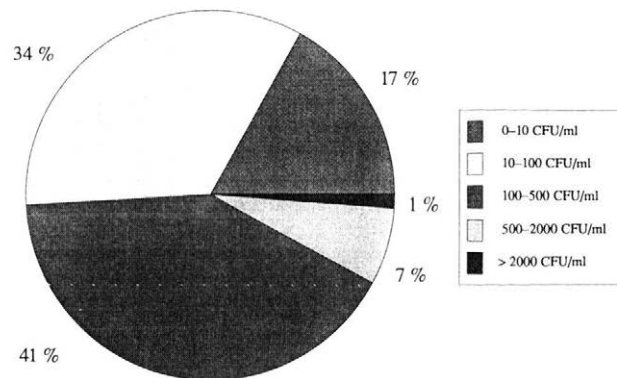
pouze 1,14 % případů. I když metodika hygienického hodnocení vzorků podle předpisu EEC 92/46 (tab. 1) vychází z více podjednotek jednoho vzorku, lze konstatovat, že 92 % analyzovaných vzorků by vyhovělo požadavkům na mléko pro technologické zpracování bez tepelného ošetření a 51 % vzorků splňovalo kritéria pro mléko k přímému konzumu. Maximální hodnota, nalezená během naší práce, činila 2.10^4 CFU/ml. Shrnutí celkových výsledků uvádí obr. 1.

Stejným způsobem byly vyhodnoceny i podsoubory vzorků pro jednotlivé kategorie dodavatelů. Zvláštní pozornost byla věnována soukromým dodavatelům a dlouhodobě zájmové oblasti našeho ústavu – regionu mlékárny KDV Zábřeh. Vzorky mléka ze soukromých farem splňují kritéria pro mléko k technologickému zpracování z 98 %, vzorky z oblasti závodu KDV Zábřeh pak z 96 %. Podstatně horší se jeví oblasti zbývající, kde uvedené hodnoty klesají na 85 %. Rozdíly jsou statisticky výsoce významné jak celkově ($P = 0,01$ %), tak mezi jednotlivými skupinami (ve všech případech $P = 0,005$ %). Srovnání uvedených kategorií prvovýrobců je znázorněno na obr. 2.

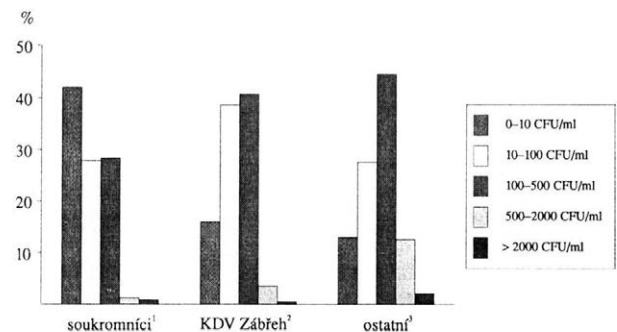
Další oblastí našeho zájmu byla dynamika vývoje obsahu *S. aureus* ve vzorcích mléka ze sledovaných regionů u sledovaných skupin dodavatelů. Obr. 3 udává změny kontaminace bazénových vzorků mléka stafylokoky v průběhu roku 1993 a 1994. Pro svoznou oblast závodu KDV Zábřeh nebyl shledán statisticky významný rozdíl v obsahu *S. aureus* mezi lety 1993 a 1994. Také mezi odpovídajícími měsíci uvedeného souboru jsme nenalezli významnější rozdíly. Oproti tomu výrazná se jevila sezonní dynamika stafylokoků, kdy mezi měsíčními soubory byl výsoce významný rozdíl ($P = 0,005$ %) s maximem v zimním období (12.–3. měsíc) a minimem v letních měsících (7.–10. měsíc).

Ze souboru naměřených dat je možno získat i přehledy dynamiky *S. aureus* pro jednotlivé dodavatele. Pro ilustraci uvádíme dva typické příklady dodavatelů. V prvním případě (ZD Žichlínek) se jedná o poměrně vysoké hodnoty stafylokokové kontaminace mléka, způsobené pravděpodobně zvýšeným výskytem latentních stafylokokových mastitid ve stádech; druhý podnik (ZD Troubelice) je typický minimální kontaminací chovů stafylokoky (obr. 4). I v případě ZD Žichlínek

se potvrdila hypotéza sezonního kolísání obsahu stafylokoků; rozdíl mezi letním a zimním obdobím je opět statisticky výsoce významný ($P = 0,01$ %) a rozdíl mezi lety 1993 a 1994 nevýznamný. Data pro ZD Troubelice nebyla hodnocena pro malý rozsah souboru.



1. Celkový přehled rozložení vzorků do skupin podle počtu *S. aureus* – An overview of milk sample distribution in the groups according to the counts of *S. aureus*



2. Frekvence výskytu *S. aureus* podle původu vzorků – Frequency of occurrence of *S. aureus* according to the producers of milk samples

¹private farmers, ²Zábřeh Factory, ³others

DISKUSE

Pro kultivaci a stanovení počtu *S. aureus* v potravinách je nejvíce rozšířen a doporučován Baird-Parker agar (Baird-Parker, 1962). Není však – a zvláště pro mléko a mléčné výrobky – zcela bezproblémovým médiem. Biotypy stafylokoků vyskytující se v mléce častěji než ostatní vykazují chybnější Egg-yolk i teluritovou aktivitu, zvláště při inkulaci na povrch média, a ani pokusy o zlepšení média zavedením termonukleázového testu (Lachica, 1984), koagulace zvířecí plazmy nebo přidavku antibiotického suplementu (Beckers aj., 1984) nevedly k průkazně lepším výsledkům (Harvey a Gilmour, 1985). Existuje zde i riziko falešně pozitivních reakcí, kdy *S. hyicus* a *S. intermedius* mohou produkovat koagulázu; nukleázu pak produkuje ještě širší spektrum stafylokoků. Z uvedených důvodů používáme v naší praxi manitolový agar se solí a fenolčervení (Chapman, 1945), jehož hlavní předností je vyšší záchytnost stafylokoků (Sedláček, osobní sdělení; Benda, nepublikováno). Obtížnější je však ode-

čet primokultur a subkultury jsou téměř nutností. Pro rutinní analýzy však bude pravděpodobně nutné vzhledem ke standardizaci metod přejít na BP agar. V dostupných literárních pramenech se nám doposud nepodařilo najít kvantitativní posouzení záchytnosti manitolového agaru vzhledem k ostatním používaným médiím. Sledování záchytnosti médií v naší laboratoři pro kmeny stafylokoků ze syrového mléka dosud není uzavřeno a bude publikováno později.

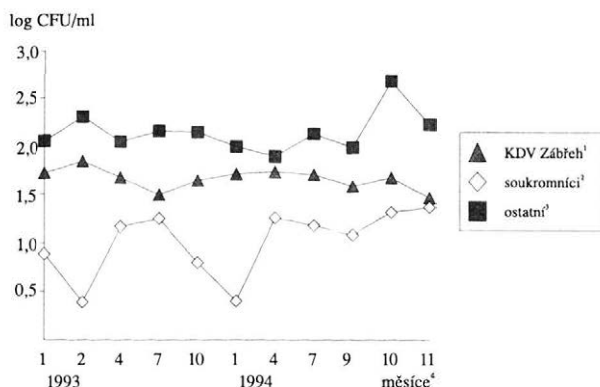
Podrobná biotypizace izolovaných kmenů stafylokoků nebyla předmětem této práce; probíhá však v současné době. Fenotypová biotypizační schémata pro *S. aureus* většinou vycházejí z práce autorů Hájek a Maršálek (1971) a Devriese (1984). Kmeny *S. aureus* v syrovém kravském mléce přísluší převážně k biotypu C (Růžičková, 1991) a produkují enterotoxiny typu C a D. Frekvence výskytu enterotoxigenických kmenů je u bovinních biotypů udávána od asi 5 % v normálním mléku (Harvey a Gilmour, 1985) až po 10–30 % v případech izolátů z mastitid (Olson aj., 1969; Niskanen a Koiranen, 1977). V ovčím mléce až 80 % kmenů izolovaných z klinických případů mastitid produkuje enterotoxiny (Gutierrez aj., 1982). Enterotoxigenitou kmenů vzhledem k jejich původu se také zabývali Olsvik aj. (1981).

Přítomnost *S. aureus* ve vzorcích syrového kravského mléka silně koreluje s výskytem stafylokokových mastitid ve stádech (Benda, dosud nepublikováno). V mléce z mastitidních čtvrtí může *S. aureus* dosáhnout počtů až 10^6 CFU/ml (Neave, 1975), v bazénovém vzorku mléka 10^2 až 10^3 (Harvey a Gilmour, 1985), což odpovídá i našim pozorováním. Podobné hodnoty lze pozorovat i v kozím mléce, kde však stafylokoky hrají mnohem větší roli v etiologii mastitid (Smith a Roguinsky, 1977; Dumoulin a Peretz, 1993).

Pokud mají stafylokoky v mléce produkovat detekovatelná množství enterotoxinů, musí se startovní koncentrace organismů v mléce pohybovat okolo 10^6 – 10^8 CFU/ml (Varadaraj a Nambudripad, 1983; Bergdoll, 1983; Freer a Arbutnot, 1982). Je tedy zřejmé, že vzhledem k výše uvedeným maximálním koncentracím *S. aureus* v syrovém mléce by muselo dojít nejprve k pomnožení. Při nízkých startovních koncentracích v mléce však stafylokoky jako relativně pomaleji rostoucí mikroorganismy jsou inhibovány v růstu ostatní přirozenou mikroflórou mléka a nedosáhnou koncentrací, potřebných k produkci enterotoxinů (Gilmour a Harvey, 1990; Gorner a Šimkovičová,

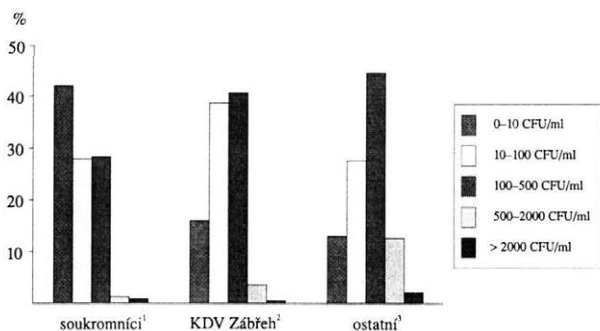
1979). Jiná situace nastane, pokud stafylokoky kontaminují relativně sterilní substrát, např. mléko již pasteurované, pokud jim nekonkurují mikroorganismy technologických startovních kultur (Radich aj., 1969; Gay aj., 1993; Rajkowski aj., 1994). Obecně platí, že syrové kravské mléko se všemi přirozenými inhibitory je horším prostředím pro růst *S. aureus* než mléko tepelně opracované (Varadaraj a Nambudripad, 1983).

Hlavním cílem naší práce bylo srovnání získaných dat s normativem EEC 92/46 pro syrové kravské mléko. Tento normativ je ve srovnání se stále platnými veterinárními předpisy ČR značně benevolentnější. Přehled ustanovení EEC, platných pro obsah *S. aureus* v mléce, uvádíme v tab. I. V naší práci nejnižších hodnot obsahu stafylokoků dosahovaly vzorky ze soukromých farem. Přesto lze v poslední době v oblasti Zábřehska pozorovat určité vyrovnávání mezi soukromíky a dodavateli typu družstev a státních statků. Důvodem bude nejspíše zvyšování počtu zvířat ve stádech soukromníků a postupný rozpad státních statků s přechodem ně-



3. Dynamika obsahu *S. aureus* v bazénových vzorcích mléka – The dynamics of *S. aureus* content in bulk milk samples

¹Zábřeh Factory, ²private farmers, ³others, ⁴months



4. Dynamika obsahu *S. aureus* pro jednotlivé dodavatele – The dynamics of *S. aureus* content for the particular producers

¹Zichlínek Cooperative Farm, ²Troubelice Cooperative Farm, ³months

kterých farem do soukromí. Tento trend však bude nutné potvrdit dalším sledováním.

Bohužel se nám v literatuře nepodařilo nalézt práci, která by se v podobné šíři zabývala analýzami syrového mléka. Proto nám chybí srovnání s jinými autory. Harvey a Gilmour (1985) publikovali výsledky pouze 36 případů. Hodnoty obsahu *S. aureus* v 1 ml syrového mléka se pohybovaly od 35 do 980 CFU/ml. Jednalo se však o vzorky pouze ze šesti farem. Zhodnocení vzhledem k normativu EEC 92/46 uvádějí pouze Dumoulin a Peretz (1993). V jejich práci bylo hodnoceno 53 farem; jednalo se však o kozí mléko. 80 % vzorků obsahovalo méně než 500 CFU *S. aureus* v 1 ml mléka, 12 % pak překračovalo 2 000 CFU/1 ml mléka. Brychta a Dvořák (1993) našli maximálně 2 000 CFU *S. aureus* v 1 ml syrového kravského mléka, neuvádějí však jiné než maximální hodnoty.

I když výsledky srovnání s normativem EEC vyznívají pro producenty mléka v oblasti KDV Zábřeh příznivě a nepotvrzují se předpoklady „posttransformačního“ zhoršování hygienických podmínek získávání syrového mléka, nelze se také spokojit s dosaženou úrovní. Hygienicky vyhovující hladina *S. aureus* v bazénovém vzorku mléka totiž ještě neznamená uspokojivý stav v oblasti subklinických a latentních mastitid (Benda, nepublikováno).

Překvapivě výrazné je také sezonní kolísání obsahu *S. aureus* v bazénových vzorcích mléka, pozorované jak u celkového souboru, tak i pro některé výběry. Pro ověření předpokládáme další sledování v uvedené oblasti. Předběžné výsledky z prosince 1994 a ledna 1995 však pozorovaný trend potvrzují. Příčiny sezonního kolísání budou obtížně kvantifikovatelné. Domníváme se, že je bude nutno hledat v ročních změnách zoohygienických podmínek a stájového mikroklimatu.

LITERATURA

ANONYM: EEC Milk Hygiene Directive 92/46/EEC of 16 June 1992. Annex A, Chapter IV: Standards to be met for collection of raw milk. Annex C, Chapter II: Microbiological criteria for milk-based products and drinking milk. Antimicrob. Agents Chemother. 34, 1992: 9.

BAIRD-PARKER, A. C.: An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. J. Appl. Bact., 25, 1962: 12–19.

BECKERS, H. J. – COUTINHO, R. A. – JANSEN, J. T. – VAN LEEUWEN, W. J.: Staphylococcal food poisoning by consumption of sterilized vanilla custard. Antonie van Leeuwenhoek, 46, 1980: 224–225.

BECKERS, H. J. – VAN LEUSDEN, F. M. – BINDSCHEDLER, O. – GUERRAZ, D.: Evaluation of a pour plate system with a rabbit plasma-bovine fibrinogen agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food. Canad. J. Microbiol., 30, 1984: 470–474.

BERGDOLL, M. S.: Enterotoxins. In: *Staphylococci and staphylococcal infections* Vol. 2. London, Acad. Press 1983: 559–598.

BRYAN, F. L.: Epidemiology of milk-borne diseases. J. Food. Protect., 46, 1983: 637–649.

BRYCHTA, J. – DVOŘÁK, B.: Zjišťování a posuzování *Staphylococcus aureus* v potravinách ve vztahu k platným normám. In: Konference o hygieně a technologii potravin, VŠVF Brno, 1993: 47–50.

CHAPMANN, G. H.: The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. J. Bact., 50, 1945: 201–203.

DEVRIESE, L. A.: A simplified system for biotyping of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. J. Appl. Bact., 56, 1984: 215–220.

DUMOULIN, E. – PERETZ, G.: Qualité bactériologique du lait cru de chèvre en France. Lait, 73, 1993: 475–483.

FREER, J. H. – ARBUTHNOTT, J. P.: Toxins of *Staphylococcus aureus*. Pharmacol. Ther., 19, 1982: 55–106.

GAY, M. F. – JAUBERT, G. – SABOUREAU, S.: Incidence des traitements technologiques sur la qualité hygiénique du lait et des fromages de chèvre à pâte molle. Lait, 73, 1993: 499–509.

GILMOUR, A. – HARVEY, J.: Staphylococci in milk and milk products. In: Symposium supplement. J. Appl. Bact., 1990: 147S–166S.

GORNER, F. – ŠIMKOVIČOVÁ, H.: Dynamika obsahu stafilokoků při fermentaci kysломlečných produktů. Českoslov. Hyg., 24, 1979: 69–80.

GUITIERREZ, L. M. – MENES, I. – GARCIA, M. C. – MORENO, B. – BERGDOLL, M. S.: Characterization and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from mastitic ovine milk in Spain. J. Food. Protect., 45, 1982: 1282–1286.

HÁJEK, V. – MARŠÁLEK, E.: The differentiation of pathogenic staphylococci a suggestion for their taxonomic classification. Zblt. Bakt. Parasit-Kde., 2/7, 1971: 176–182.

HARVEY, J. – GILMOUR, A.: Application of current methods for isolation of staphylococci in raw bovine milk. J. Appl. Bact., 59, 1985: 207–221.

LACHICA, R. V.: Egg-yolk free Baird-Parker medium for the accelerated enumeration of foodborne *Staphylococcus aureus*. Appl. Envir. Microbiol., 48, 1984: 870–871.

NEAVE, F. K.: Diagnosis of mastitis by bacteriological methods alone. Int. Dairy Federation Doc., 85, 1975: 19–36.

NISKANEN, A. – KOIRANEN, L.: Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. J. Food. Protect., 40, 1977: 543–548.

NUNEZ, M. – CHAVARRI, B. E. – GARCIA, B. E. – GAYTAN, L. E.: The effect of lactic starter inoculation and storage temperature of the behaviour of *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae*. Food Microbiol., 3, 1986: 235–242.

OLSON, J. C. et al.: Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from acute cases of bovine mastitis. J. Dairy Sci., 52, 1969: 879 s.

OLSVIK, O. – BERDAL, B. P. – FOSSUM, K. – OMLAND, T.: Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* related to the origin of the strains. Act. Path. Microbiol. Scand., 89, 1981: 423–426.

- RADICH, R. – SANDINE, W. R. – ELLIKER, P. R.: Inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Streptococcus diacetylactis* in milk and cream filling. J. Dairy Sci., 52, 1969: 880.
- RAJKOWSKI, T. K. – CALDERONE, M. S. – JONES, E.: Effect of polyphosphate and sodium chloride on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in ultra-high temperature milk. J. Dairy Sci., 77, 1994: 1503–1508.
- REITER, B. – FEWINS, B. G. – FRYER, T. F. – SHARPE, M. E.: Factors affecting the multiplication and survival of coagulase-positive staphylococci in Cheddar cheese. J. Dairy Res., 31, 1964: 261–272.
- RŮŽIČKOVÁ, V.: Nové poznatky v biotypizaci *Staphylococcus aureus* z prvovýroby mléka. Veter. Med. (Praha), 36, 1991: 393–399.
- SMITH, M. C. – ROGUINSKY, M.: Mastitis and other diseases of the goats udder. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 171, 1977: 1241–1248.
- VARADARAJ, M. C. – NAMBU DRIPAD, V. K. N.: Growth and production of thermostable deoxyribonuclease and enterotoxin by *Staphylococcus aureus* in milk. Milchwissenschaft, 38, 1983: 23–26.

Došlo 18. 1. 1995

Kontaktní adresa:

RNDr. Pavel B e n d a, Výzkumný ústav pro chov skotu, 788 13 Rapotín, Česká republika
Tel. 0649/41 01, fax 0649/57 02

DOT-BLOT TECHNIQUE FOR THE QUANTITATIVE DETECTION OF THE WHEAT PROTEIN IN THE SAUSAGES

DOT-BLOT TECHNIKA PRE KVANTITATÍVNE STANOVENIE PŠENIČNÉHO PROTEÍNU V SALÁMACH

A. Marcin¹, R. Fencík², E. Beličková¹, P. Siklenka¹

¹*Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic*

²*Research Institute of Plant Production, Piešťany, Slovak Republic*

ABSTRACT: A simple immunological method is described by which it is possible to detect the wheat flour according to wheat protein in the heat-processed meat products. The wheat proteins were extracted with a buffer TRIS-NaCl (0.02 mol/l, 0.5 mol/l) from: a) wheat flour; b) model meat products with addition of wheat flour (3.2, 3.2, 3.6, 0.8, 0.4 and 0.2%); c) commercial meat products containing wheat flour (sausages – S, P, PF). The aliquots of the extracts were subjected to an immunological dot-blot test. The extracts from the wheat flour and the model meat products were used for calibration of this method. The quantitative evaluation of the test was based on the spectrophotometric determination of the quantity of the violet stain on the nitrocellulose (NC) strip surfaces. The strips were immersed into the acetone and the absorbance were determined at 580 nm. The screening of the samples by dot-blot procedure proved to be an efficient way of the wheat flour determination in the cooked meat products at 0.2% level (i.e. 0.375 ng of wheat protein applied to the NC strip). Since the wheat antibody (primary antiserum) has no crossreactivity with pork or beef, this technique can be used for the detection of plant proteins in the mentioned mixtures.

meat products; wheat flour; wheat protein; dot-blot; sausage; immunodetection

ABSTRAKT: Na kvantifikáciu pšeničného proteínu v tepelne opracovaných salámach bola použitá sendvičová dot-blot technika. Proteíny vyzolované z pšeničného zrna boli použité na imunizáciu králikov (novozélandský biely) a následnú výrobu primárnej protilátky. Ako sekundárna protilátka boli použité komerčne vyrábané prasačie antikráličie IgG – Swar-Px (Úsol Praha). Vo vlastnom experimente bola stanovená koncentrácia pšeničného proteínu v komerčne vyrábaných salámach s prídavkom pšeničnej múky a v modelových mäsových výrobkoch so známou koncentráciou pšeničného proteínu (10; 5; 2.5; 1.25; 0.625%). Ako porovnávací štandard slúžil lyofilizovaný pšeničný sériovo nariadený proteín. Kvantifikácia bola vykonaná spektrofotometricky, množstvo fialovej farbičky vzniknuté po reakcii peroxidázy a substrátu 4-chloro-1-naftolu na povrchu nitrocelulóзовých membrán po ich rozpustení v acetóne bolo priamo úmerné absorbcii pri 580 nm a jej hodnota bola porovnávaná s absorbciou štandardu. Citlivosť danej metodiky bola 0.2% (t. j. 0.52 ng aplikovaného pšeničného proteínu).

mäsové výrobky; pšeničná múka; pšeničný proteín; dot-blot; saláma; imunodetekcia

ÚVOD

Rastlinné proteíny sa pridávajú do mäsových výrobkov za účelom zvýšenia emulgačnej kapacity a tiež schopnosti viazať vodu. Použitie kazeínu, proteínu vyzolovaného z bavníkových semien a tiež srvátkového a sójového proteínu, ako emulgátorov, bolo už publikované (Janssen a i., 1987). V receptúrach našich výrobkov sa na tento účel používa pšeničný proteín. Správna identifikácia kvantity pšeničného proteínu vo výrobkoch je dôležitá z dôvodu možných ekonomických strát, ktoré vznikajú čiastočnou náhradou živočíšneho proteínu rastlinným alebo pri predávkovaní nad množstvo stanovené normou.

Na identifikáciu rastlinných proteínov v surových mäsových výrobkoch bolo použitých niekoľko techník (Bailey a i., 1978; Flint a Meech, 1978; Patterson a Jones, 1984). Avšak neimunochemické metódy pre detekciu rastlinných proteínov (Olman a Hitchcock, 1980; Eldridge a Wolfe, 1980; Eldridge, 1981; Kaiser a Krause, 1985) nie sú dostatočne citlivé a špecifické. Imunologické metódy ako imunodifúzia a imunoelktroforéza (Kaltwasser a i., 1984) boli použité predovšetkým na detekciu spomenutých proteínov v surových mäsových výrobkoch. Ich nevýhodou je neschopnosť detekovať denaturované a teda nerozpustné proteíny. Hitchcock a i. (1981) elegantne prekonal tieto

problémy a na detekciu použil veľmi citlivú ELISA metódu na stanovenie sójového proteínu v mäsoových výrobkoch. Táto metóda je však značne ekonomicky náročná na prístrojové vybavenie. Oveľa jednoduchšiu (imunologickú sendvičovú) metódu dot-blot publikovali Janssen a i. (1985). Jej výhodou je jednoduchá príprava vzoriek, nenáročnosť na prístrojové vybavenie a adaptabilnosť pre terénne a laboratórne podmienky.

Cieľom našej práce bolo pripraviť jednoduchú, citlivú a ekonomicky nenáročnú imunologickú detekčnú techniku (dot-blot) na kvantitatívnu identifikáciu pšeničného proteínu v tepelne opracovaných mäsoových výrobkoch.

MATERIÁL A METÓDY

Reagencie

Tween 20 a 4-chloro-1-naftol (SERVA, Heidelberg, Nemecko), Synpor membránové filtre (Uhlíněves, Česká republika).

Antiséra

Prasačie protikráličie IgG antisérum značené peroxidázou – SwaR-Px (ÚSOL, Praha, Česká republika). Prvá vzorka králičej protilátky proti pšeničnému proteínu (izolovaná zo zŕn pšenice) bola darom z Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch, Slovenská republika.

Izolácia pšeničného proteínu z múky

- K 200 g pšeničnej múky bolo pridané 600 ml acetónu o teplote 0 °C za účelom delipidovania. Táto suspenzia bola vložená do chladiaceho boxu (s vnútornou teplotou 0 °C) na dobu 60 min.
- Následne bol acetón oddelený centrifugáciou – 2 000 g po dobu 15 min.
- Sediment bol použitý na dvojstupňovú izoláciu pšeničného proteínu. V prvom stupni bol po dobu jednej hodiny miešaný s TRIS-NaCl pufrum (0,02 mol/l Tris a 0,5 mol/l NaCl) v pomere 200 g sedimentu a 600 ml TRIS-NaCl pufru pri laboratórnej teplote.
- Suspenzia bola centrifugovaná pri 2 000 g po dobu 15 min. Supernatant obsahoval rozpustený pšeničný proteín. Sediment bol použitý v druhom stupni izolácie pšeničného proteínu.
- Supernatanty z oboch extraktov obsahujúce rozpustený pšeničný proteín boli dialyzované oproti destilovanej vode (veľkosť pórov dialyzačnej membrány – 10 kDa). Dialyzát bol následne lyofilizovaný.

Príprava králičieho antiséra proti pšeničným proteínom

V lyofilizovanom proteíne po termickom ošetrení (ohriatie na teplotu 100 °C po dobu 5 min) bola stanovená molekulová hmotnosť jednotlivých peptidových frakcií za použitia SDS-PAGE (laurylsulfátovej poly-

akrylamidovej gélovej elektroforézy) podľa Laemmliho (1970). Tento proteín pozostával z peptidov o molekulových hmotnostiach 61, 36, 21 a 8 kDa.

Proteín bol použitý na imunizáciu štyroch králikov plemena novozélandský biely podľa obvyklej imunizačnej schémy (Dunbar a i., 1990). Antigén bol emulzifikovaný za použitia dvoch 10 ml striekačiek, ktoré boli vzájomne prepojené trubičkou. Prvá striekačka obsahovala 2 ml fyziologického roztoku (pH 7,0) a druhá obsahovala rovnaké množstvo Freundovho kompletného adjuvans, do nej bol pridaný lyofilizovaný, tepelne opracovaný pšeničný proteín v množstve 0,5 g. Emulzifikácia imunogénu bola vykonaná vzájomným premiešavaním medzi oboma striekačkami. Zmes emulzifikovaného imunogénu bola aplikovaná intradermálne. Celkovo bolo aplikované 1 ml imunogénu pre jedného králika na 10 miest do dorzálnych častí chrbta. Reimunizácia bola vykonávaná na 14., 21., 28. a 42. deň po prvej imunizácii po imunoelktroforetickom posúdení špecificity protilátok v sére (Dunbar a i., 1990).

Krv od králikov bola odobraná zo srdca. Hrubá frakcionácia Ig zo séra bola vykonaná vysofvaním síranom amónnym (Dunbar a i., 1990). Dosiahnutý titer bol 1 : 3 000. Testovali sme tiež skrížené reakcie pripravených imunoglobulínov s bielkovinami izolovanými z bravčového a hovädzieho mäsa.

Príprava modelových mäsoových výrobkov (MM)

Po pomletí chudého bravčového mäsa bola pšeničná múka pridaná do takto vytvorenej pasty. Výsledná koncentrácia pšeničnej múky v modelovom mäsovom výrobku bola 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 %.

Komerčné, tepelne upravené mäsové výrobky použité v experimente

- Špekáček-S, párková klobása-P, jemné párky-PF (obsahujúce pšeničný proteín) a
- desiatová-D, liptovská-L, parížska saláma-PA (neobsahujúce pšeničný proteín) boli získané z miestnej obchodnej siete.

Izolácia proteínov z komerčných mäsoových výrobkov

Mäsové výrobky boli pomleté a vzniknutá pasta bola delipidovaná acetónom pri teplote 0 °C po dobu 15 min (poměr pasty a acetónu 1 : 4). Ďalší postup viď bod 3b, c, d.

Extrakt z komerčných tepelne upravených mäsoových výrobkov obsahovali však živočíšne i pšeničné proteíny.

Príprava kalibračných štandard

Kalibračné štandardy pozostávali z dvoch skupín:

- prvá skupina – lyofilizovaný pšeničný proteín sériovo nariedený v TBS pufrí (1 200, 600, 300, 150 a 75 ng/ml)

Roztok ¹		Riedenie ²	Čas ³ (min)
Blokovanie aktívnych miest ⁴	a	–	15
Primárna As ⁵	b	–	20
Premývanie ⁶	TBS-TWEEN 20	–	3 x 5
Sekundárne As ⁷	SwAR/Px	–	20
Premývanie	TBS-TWEEN 20	–	3 x 5
Aplikácia substrátu ⁸	4-chloro-1-naftol s H ₂ O ₂ [*]	–	5–7**
Premývanie	TBS-TWEEN 20	–	3 x 5
Premývanie	redistilovaná H ₂ O ⁹ – 10	–	

a = 5% odtučnené práškové mlieko rozpustené v TBS pufrí (10 mmol/l TRIS-HCl, 0,9 % NaCl, pH 7,2; Tween 20 0,02 %) – 5% skim milk powder dissolved in TBS buffer (10 mmol/l TRIS-HCl, 0.9% NaCl, pH 7.2; Tween 20 0.02%)

b = králičie primárne antisérum – rabbit primary antiserum

* = substrát: 25 mg 4-chloro-1-naftolu rozpustí v 5 ml etanolu, zmiešať s 45 ml TBS pufru, po 3 min filtrovať a pridať 0,1 ml H₂O₂ (3%) k filtrátu – substrate: dissolve 25 mg 4-chloro-1-naphthol in 5 ml ethanol, mix with 45 ml TBS buffer, filtrate and after 3 min add 0.1 ml H₂O₂ (3%) to the filtrate

** = k vyvolaniu sfarbenia dôjde o niekoľko minút – staining will be induced in a few minutes

¹solution, ²dilution, ³time, ⁴blocking of active spots, ⁵primary As, ⁶washing, ⁷secondary As, ⁸substrate application, ⁹redistilled H₂O

b) druhá skupina – proteíny izolované z modelových mäsových výrobkov s definovaným prídavkom pšeničnej múky (3,2; 1,6; 0,8; 0,4 a 0,2 %).

Dot-blot metóda na kvantifikáciu pšeničného proteínu v izolátoch

Vzorky boli aplikované na dve suché nitrocelulózy membrány v trojiciach po 5 µl. Na prvú membránu bola naaplikovaná prvá skupina kalibračných štandard (8a) a na ďalšiu druhá skupina kalibračných štandard (8b).

Tri slepé vzorky obsahovali TBS pufer, BSA (bovinný sérový albumín) a extrakt z modelového mäsového výrobku (bez prídavku pšeničného proteínu) boli aplikované na obe nitrocelulózy membrány za účelom odčítania pozadia.

Platne s naaplikovanými vzorkami boli inkubované pri izbovej teplote po dobu 30 min. Ďalší postup viz tab. I.

Nitrocelulózy platňa bola vysušená v tme a narezaná na rezance tak, že na jednom sa nachádzala jedna vzorka naaplikovaná v trojici a následne boli rezance jednotlivito rozpustené v 1 ml acetónu (Volker a i., 1989). Po 10-minútovej inkubácii nitrocelulózy rezancov v acetóne bola odmeraná absorbancia jednotlivých vzoriek oproti čistému acetónu pri 580 nm.

Štatistická analýza experimentov bola vykonaná testom analýzy variácií. Rozdiely medzi meraniami boli vyhodnotené *t*-testom.

VÝSLEDKY

Na obr. 1 je znázornený výsledok imunologickej analýzy za použitia sendvičovej techniky dot-blot použitej na kvantifikáciu pšeničného proteínu vo vzor-

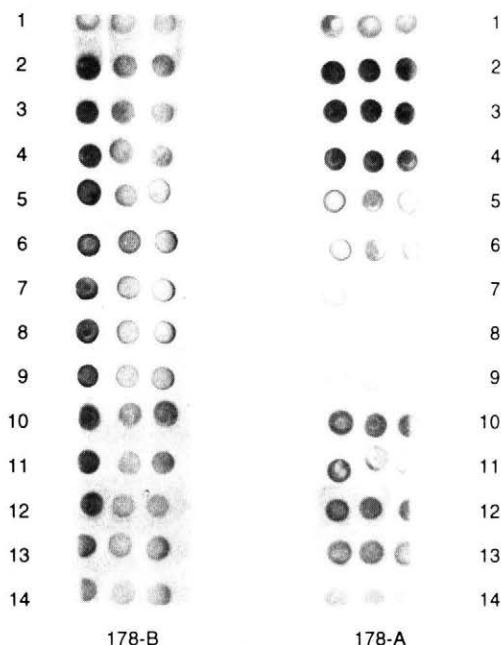
kách komerčných tepelne opracovaných mäsových výrobkov. V prvom prípade (1A) na kalibráciu slúžil sériovo nariadený lyofilizovaný pšeničný proteín: 1 200, 600, 300, 150 a 75 ng/mla v druhom prípade (1B) extrakty proteínov z modelových mäsových výrobkov s klesajúcou koncentráciou pšeničnej múky: 3,2; 1,6; 0,8; 0,4 a 0,2%. Extrakty z komerčných tepelne opracovaných mäsových výrobkov – S (špekáček), P (párková klobása) a PF (jemné párky), do ktorých sa pri úprave pridáva pšeničná múka, vytvorili výrazné stopy. Odlišné výsledky boli dosiahnuté u ďalších komerčných tepelne opracovaných mäsových výrobkov bez prídavku pšeničnej múky – D (desiatová), L (liptovská), PA (parížska saláma), farebné stopy boli nevýrazné.

Na obr. 2 je graficky znázornená koncentrácia pšeničného proteínu v komerčných tepelne upravených mäsových výrobkoch za použitia dvoch typov kalibračných štandard:

- sériovo riedeného lyofilizovaného pšeničného proteínu a
- extraktov z modelových mäsových výrobkov, stanovená spektrofotometrickou kvantifikáciou intenzity farebných stôp na nitrocelulózy membráne.

DISKUSIA

Chybné pozitívne reakcie vznikajúce na základe skrížených reakcií a nešpecifických väzieb neboli v experimentoch pozorované pri použití oboch králičích antisér. Percentuálny obsah pšeničného proteínu v mäsových výrobkoch je možné stanoviť porovnávaním intenzity stôp so sériovo nariadeným lyofilizovaným pšeničným proteínom, a to buď vizuálne (semikvantitatívne vyhodnotenie) alebo spektrofotometricky (kvantitatívne vyhodnotenie). Pri spektrofotometrickom vy-



1. Dôkaz pšeničného proteínu vo vzorkách dot-blot technikou – Immunological staining (wheat protein antiserum)

A: 1 – MM, 2 – sériovo nariadený lyofilizovaný pšeničný proteín – series diluted lyophilized wheat protein (1 200 ng/ml), 3 – (60 ng/ml), 4 – (300 ng/ml), 5 – (150 ng/ml), 6 – (75 ng/ml), 7 – BSA, 8 – TBS pufer, 9 – D, 10 – P, 11 – PA, 12 – PF, 13 – S, 14 – L. B: 1 – MM, 2 – modelový mäsný výrobok s pšeničným proteínom – model meat product with wheat protein (3,2 %), 3 – (1,6 %), 4 – (0,8 %), 5 – (0,4 %), 6 – (0,2 %), 7 – BSA, 8 – TBS pufer, 9 – D, 10 – P, 11 – PF, 12 – S, 13 – PA, 14 – L.

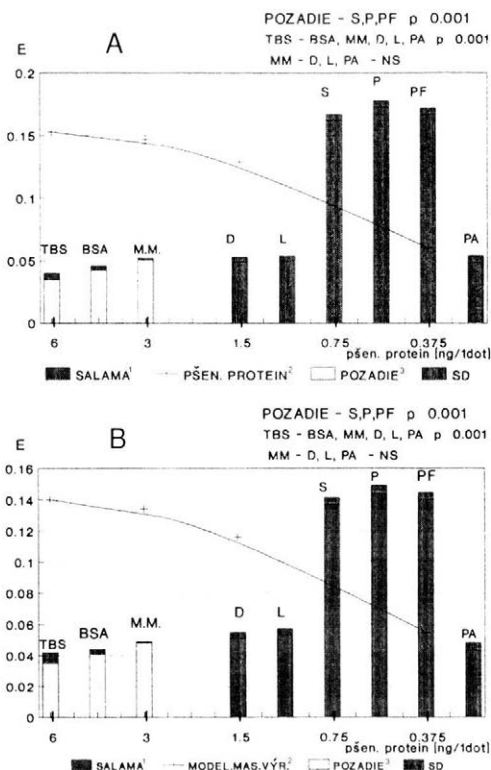
MM – modelový mäsný výrobok (bez pšeničného proteínu), D – saláma desiatová, P – parková klobása, PA – parížsky salám, PF – párky jemné, S – špekáček, L – liptovská klobása, TBS pufer – (0,02 mol/l TRIS; 0,5 mol/l NaCl), BSA – boviný sérový albumín (1 mg/ml)

MM – model meat (wheat protein absent); D, P, PA, PF, S, L – commercial sausages; TBS bufer – (0,02 mol/l TRIS; 0,5 mol/l NaCl); BSA – bovine serum albumin (1 mg/ml)

hodnotení farebných stôp na membráne koncentrácia pšeničného proteínu v extraktach sa stanoví na základe nameranej absorbancie odčítaním z kalibračnej krivky.

Na kalibráciu je výhodnejšie použiť extrakty z modelových mäsových výrobkov s prídavkom pšeničnej múky vzhľadom k tomu, že pozadie vytvorené živočísnymi proteínami je porovnateľné s pozadím vyskytujúcim sa pri kvantifikácii pšeničných proteínov v komerčných mäsových výrobkoch.

Detekčná citlivosť nami popísanej metódy je 0,2 %. Je porovnateľná s metodikami podobného typu už vyvinutými. Jan s s e n a i. (1987) použili metódu elektroblotting na detekciu sójového proteínu a pšeničného gluténu a dosiahol citlivosť 0,1%. Med i n a (1988)



2. Kvantifikácia koncentrácie pšeničného proteínu dot-blot metódou po spektrofotometrickom vyhodnotení. A: komerčné tepelne opracované mäsové výrobky: ako kalibračný štandard bol použitý lyofilizovaný pšeničný proteín; B: komerčné tepelne opracované mäsové výrobky: ako kalibračný štandard bol použitý proteín izolovaný z modelových mäsových výrobkov – The plot of amounts of the wheat protein (albumin and globulin fraction) measured by dot-blot technique after spectrophotometrical quantitation in: A – commercial cooked sausage products by using diluted freeze dried wheat protein as a calibration standard; B – commercial cooked sausage products, protein isolated from the model meat product was used as a calibration standard

¹sausage, ²wheat protein, ³background

aplikoval nepriamu ELISA techniku na detekciu a meranie kvantít sójového proteínu v extraktach modelových frankfurtských párik a komerčných tepelne opracovaných a neopracovaných párikach. Podarilo sa mu kvantifikovať sójový proteín v rozsahu citlivosti od 0–5 %.

Ďalšie zvýšenie detekčnej citlivosti tejto metodiky je možné za použitia špecifického antiséra pripraveného proti natívnym termorezistentným antigénom, hoci tepelná rezistencia proteínov nie je absolútna.

V závere môžeme konštatovať, že sme vyvinuli jednoduchú sendvičovú imunologickú metódu založenú na technike dot-blot. Táto je vhodná na semikvantitatívne (vizuálne) a tiež kvantitatívne (spektrofotometrické) vyhodnotenie koncentrácie pšeničného proteínu v te-

pelne opracovaných mäsových výrobkoch. Detekčná citlivosť je na úrovni 0,2 % (t. j. 0,52 ng aplikovaného izolovaného pšeničného proteínu). Keďže primárne králičie antisérum nereaguje skrížene s bielkovinami bravčového alebo hovädzieho mäsa, táto technika môže byť použitá na detekciu pšeničného proteínu aj v mäsových výrobkoch vyrobených z týchto druhov mias.

LITERATÚRA

BAILEY, F. J. – LLEWELLYN, C. H. – HITCHCOCK, C. H. S. – DEAN, A. C.: The determination of soya protein in meat products using peptide analysis and the characterization of the specific soya peptide used in the calculations. *Chem. and Ind.*, 1, 1978: 477–482.

DUNBAR, B. S. – SCHWOEBEL, E. D.: Preparation of polyclonal antibodies. *Meth. Enzymol.*, 182, 1990: 663–670.

ELDDRIDGE, A. C.: Determination of soya protein in processed foods. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 58, 1981: 483–485.

ELDRIDGE, A. C. – WOLFE, W. C.: Analysis of soya protein in meat products. In: *Proc. 2nd World Soybean Res. Conf.*, 1980: 118–145.

FLINT, F. O. – MEECH, M. V.: Quantitative determination of texturized soya protein by a stereological technique. *Analyst*, 103, 1978: 252–261.

HITCHCOCK, C. H. S. – BAILEY, F. J. – CRIMES, A. A. – DEAN, D. A. G. – DAVIES, P. J.: Determination of soya proteins in food using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) procedure. *J. Sci. Food. Agric.*, 32, 1981: 157–165.

JANSSEN, F. W. – VOORTMAN, G. – De BAAIJ, J. A.: Fen snelle screeningsmethode voor sojaeiwit in vleeswaren

door middel van een enzyme immunoassay op nitrocellulose. *De Ware (N) – Chemicus*, 15, 1985: 42–45.

JANSSEN, F. W. – VOORTMAN, G. – De BAAIJ, J. A.: Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin and soy protein in heated meat products by electrophoresis, blotting and immunoperoxidase staining. *J. Agric. Food. Chem.*, 35, 1987: 563–567.

KAISER, K. P. – KRAUSE, J.: Analytik von Proteinen in Lebensmitteln mit elektrophoretischen Verfahren. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 180, 1985: 181–185.

KALTWASSER, E. – BAUDNER, S. – GUNTHER, H. O.: Immunochemical determination of textured soya protein (TVP). *Fleischwirtschaft*, 64, 1984: 722–723.

LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 1970: 680–685.

MEDINA, M. B.: Extraction and quantitation of soy protein in sausages by ELISA. *J. Agric. Food. Chem.*, 36, 1988: 766–771.

OLSMAN, W. J. – HITCHCOCK, C.: Detection and determination of vegetable proteins in meat products. In: KING, R. D. (ed.): *Developments in Food Analysis Techniques*. London, Appl. Sci., 1980: 255–260.

PATTERSON, R. L. S. – JONES, S. J.: Immunoassay in Food Analysis. In: MORRIS, B. A. – CLIFFORD, M. N. (eds.): *Elsevier Appl. Sci.*, London, 1985: 87–94.

VOLKER, T. A. – HERMAN, E. M. – CHRISPEELS, M. J.: *In vitro* mutated phytohemagglutinin genes expressed in tobacco seeds. Role of glycans in protein targeting and stability. *Pl. Cell*, 1, 1989: 95–104.

Došlo 15. 7. 1995

Kontaktná adresa:

MVDr. Andrej Marcin, Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/633 20 11, fax 095/633 18 53

Upozornění pro autory vědeckých časopisů

Z důvodu rychlejšího a kvalitnějšího zpracování grafických příloh (grafů, schémat apod.) příspěvků zaslaných do redakce Vás žádáme o jejich dodání kromě tištěné formy i na disketách.

Týká se to samozřejmě těch grafických příloh, které byly vytvořeny v nějakém programu PC (např. CorelCHART, Quatro Pro, Lotus 1-2-3, MS Excel). Vzhledem k tomu, že nejsme schopni upravit a použít pro tisk všechny typy (formáty) grafických souborů, žádáme Vás, abyste nám také kromě originálních souborů (např. z MS Excel typ *.XLS) zasílali grafické předlohy vyexportované jako bodovou grafiku v jednom z těchto formátů:

Bitmap	*.BMP
Encapsulated Postscript	*.EPS
Graphic Interchange Format	*.GIF
Mac paint	*.MAC
MS Paint	*.MSP
Adobe Photoshop	*.PSD
Scitex	*.SCT
Targa	*.TGA
Tag Image File Format	*.TIF

Redakce časopisu

SURVIVAL OF MICROSCOPIC FILAMENTOUS FUNGI UNDER VARIOUS CONDITIONS OF TEMPERATURE

PREŽÍVANIE MIKROSKOPICKÝCH VLÁKNITÝCH HÚB ZA RÔZNYCH TEPLOTNÝCH PODMIENOK

A. Laciaková, A. Kočíšová, D. Kukučka

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Time required for devitalization of *Mucor fragillis*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium glabrum* and *Aspergillus niger* germs at temperatures of 22, 37, 60 °C was determined under laboratory conditions. All of the tested strains withstood the temperature 22 °C during the period of 42 days in Sabouraud agar. At the temperature of 37 °C devitalization appeared in the following order: *F. moniliforme* 14 days, *P. glabrum* 21 days, *M. fragillis* 28 days, *A. niger* 35 days. Temperature of 60 °C devitalized all tested strains of micromycetes within 5 hours. *F. moniliforme* appeared to be the most susceptible among 4 tested strains while *M. fragillis* was the less susceptible.

microscopic filamentous fungi; temperature; devitalization

ABSTRAKT: Za laboratórnych podmienok bol stanovený čas potrebný na devitalizáciu mikromycét *Mucor fragillis*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium glabrum* a *Aspergillus niger* pri teplotách 22, 37, 60 °C. Všetky nami testované kmene v prostredí Sabouraudovho média odolávali teplote 22 °C po dobu 42 dní. Pri teplote 37 °C došlo k devitalizácii v nasledovnom zostupnom poradí: *F. moniliforme* 14 dní, *P. glabrum* 21 dní, *M. fragillis* 28 dní, *A. niger* 35 dní. Pri teplote 60 °C došlo už po 5-hodinovej expozícii k devitalizácii všetkých nami testovaných kmeňov. Najcitlivejším v pokuse sa javil *F. moniliforme* a najmenej citlivým *M. fragillis*.

devitalizácia; teplota; mikroskopické vláknité huby

ÚVOD

Mikroskopické vláknité huby sa vyskytujú v prírode vo všetkých oblastiach životného prostredia človeka a sú dôležitou súčasťou biocenózy. Mikroskopické vláknité huby sú považované v životnom prostredí nielen za biologického činiteľa, ale tiež aj za činiteľa chemického ak máme na mysli pôsobenie ich metabolitov, a to či už v zmysle korozívnej činnosti na rôzne materiály, alebo ich pôsobenie na nutričné či senzorické zmeny potravín a krmív. Z týchto dôvodov poznanie ich životných cyklov je dôležité pre ich ďalší výskum a použitie.

Cieľom našej práce bolo za laboratórnych podmienok sledovať aký dlhý čas sú schopné prežívať vytypované kmene mikroskopických vláknitých húb v prostredí Sabouraudovho média teploty 22, 37 a 60 °C.

MATERIÁL A METÓDA

Na testáciu boli použité kmene (z Českej zbierky mikroorganizmov v Brne) *A. niger* (F-330), *M. fragillis* (F-236), *F. moniliforme* (F-793), *P. glabrum* (F-309). Kultúry boli naočkované na povrch Sabouraudovho agaru a pri teplote 22 °C rástli počas 14 dní. Po

14 dňoch po stanovení mikroskopického stavu kultúr sa k agaru s kultúrou pridalo 5 ml sterilného fyziologického roztoku. Zriedovacou metódou vo fyziologickom roztoku sa zisťoval počet zárodkov na Sabouraudovom agare. 1 ml suspenzie sa pridával k dvojnásobne koncentrovanému Sabouraudovmu médiu a skúmavky sa vkladali do vodného kúpeľa, ktorého teplota bola nastavená na 22, 37 a 60 °C.

Tri paralelné skúmavky sa exponovali po dobu 24 h, 7, 14, 21, 28, 35 a 42 dní pri teplotách 22 a 37 °C a pri teplote 60 °C 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 24 hodín. Teplota v tekutine sa sledovala kontrolným slepým pokusom. Skúmavky po uvedenej expozičnej dobe boli inkubované pri laboratórnej teplote osem až 14 dní. Na základe rastu kultúry v médiu bola stanovená teplota a čas potrebný k devitalizácii zárodkov.

VÝSLEDKY

V našej práci sme porovnávali čas, ktorý je potrebný k devitalizácii mikromycét *A. niger*, *M. fragillis*, *F. moniliforme*, *P. glabrum* pri teplotách 22, 37, 60 °C.

Teplotu 22 °C prežívali všetky nami testované kmene mikroskopických vláknitých húb aj po nami maximálne testovanej 42-dňovej expozičnej dobe.

Pri teplote 37 °C (tab. I) sme dosiahli nasledovné zostupné poradie devitalizovaných zárodkov: *F. moniliforme* 14 dní, *P. glabrum* 21 dní, *M. fragillis* 28 dní, *A. niger* 35 dní.

V tab. II sú zaznamenané výsledky dosiahnuté pri 60 °C (udávané v h), pretože prakticky po 5-hodinovej expozícii boli všetky nami testované kmene mikroskopických vlákňitých húb devitalizované.

DISKUSIA

Z každodenných skúsenosti vieme, že mikroskopické vlákňité huby sú veľmi rozšírenými mikroorganizmami. Môžu rásť takmer všade aj vo veľmi skromných podmienkach. Napádajú organizmy tak rastlinnej, ako aj živočíšnej ríše. Pri prežívaní mikroskopických vlákňitých húb vo výrobných procesoch zohráva dôležitú úlohu ich teplotné optimum (Fassatiová, 1979). Schopnosť prežívania sa sleduje stanovením času, ktorý je potrebný pre ich úplnú devitalizáciu.

Teplotné optimum podľa údajov Billa (1973) je dané druhovými vlastnosťami a kultivačnými podmienkami. Minimálna teplota potrebná pre rast mikromycét sa pohybuje od 0 do +5 °C. Optimálna teplota pre druhy rodů *Penicillium* a *Aspergillus* sa pohybuje v roz-

medzí +25 až +30 °C a pre *Fusarium* +30 až +35 °C (Wolff, 1949). Podľa údajov Jesenskej (1984) však existujú mikroskopické vlákňité huby, ktoré odolávajú bežným teplotám a sú schopné prežívať účinkov zvýšených teplôt (70, 80, 90 °C) sú to tzv. termorezistentné mikromycéty. Z vedeckého hľadiska však hranica medzi termorezistentnými a termosenzitívnymi druhmi mikromycét nebola dosiaľ stanovená (Piecková a i., 1992). O rozličnej odolnosti mikroskopických vlákňitých húb sa zmieňujú aj Bukováková a Vozár (1987), ktorí udávajú, že pre rast a klíčenie konidií rodu *Fusarium* je navhodnejšou teplotou 25 °C.

O rozličnej odolnosti mikroskopických vlákňitých húb voči teplotám sme sa presvedčili aj v našej práci, z ktorej možno dedukovať, že najodolnejším zo štyroch testovaných kmeňov bol *M. fragillis*, ktorý devitalizovala teplota 60 °C až po 4-dennej expozícii, teplota 37 °C po 21-dennej expozícii, ale teplotu 22 °C prežíval aj po nami maximálne testovanej 42-dennej expozícii. Najmenej odolným sa javil *F. moniliforme*, ktorý pri teplote 37 °C bol devitalizovaný po 14-dennej expozícii a pri teplote 60 °C po jednej hodine.

Záverom je potrebné zdôrazniť, že nepriaznivé vlastnosti mikroskopických vlákňitých húb na rôzne organizmy a ich schopnosť produkovať mykotoxíny nás nútia k tomu, aby sme sa intenzívnejšie zaoberali štúdiom

I. Prežívanie mikromycét v sabouraudovej pôde pri teplote 37 °C – Survival of micromycetes in sabourad agar at a temperature of 37 °C

Expozičná doba (dni) ¹	Testovanie mikromycét ²			
	<i>A. niger</i>	<i>M. fragillis</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>P. glabrum</i>
Počátečný počet kolónií ³	1,8.10 ⁴	2,5.10 ⁴	1,5.10 ⁴	2,7.10 ⁴
1	1,8.10 ⁴	2,5.10 ⁴	1,5.10 ⁴	2,7.10 ⁴
7	1,6.10 ³	3,9.10 ²	1,5.10 ³	2,0.10 ²
14	1,5.10 ²	1,6.10	0	1,5.10
21	4,1.10	1,2.10	0	0
28	8,0	0	0	0
35	0	0	0	0
42	0	0	0	0

¹time of exposition (days), ²tested micromycetes, ³initial number of colonies

II. Prežívanie mikromycét v sabouraudovej pôde pri teplote 60 °C – Survival of micromycetes in sabourad agar at a temperature of 60 °C

Expozičná doba (h) ¹	Testovanie mikromycét ²			
	<i>A. niger</i>	<i>M. fragillis</i>	<i>F. moniliforme</i>	<i>P. glabrum</i>
Počátečný počet kolónií ³	5,2.10 ⁴	2,5.10 ⁴	1,6.10 ³	3,1.10 ⁵
30 min	4,8.10 ⁴	2,5.10 ⁴	1,2.10 ²	4,3.10 ⁴
1	1,0.10 ²	1,8.10 ⁴	1,1.10 ¹	2,8.10 ⁴
2	0	1,2.10 ⁴	0	1,5.10 ⁴
3	0	2,0.10 ³	0	1,5.10 ³
4	0	2,8.10 ²	0	1,0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
24	0	0	0	0

¹time of exposition (h), ²tested micromycetes, ³initial number of colonies

životných podmienok rastu mikromycét a zamerali sa na vypracovanie preventívnych opatrení proti ich rozmnožovaniu v prirodzených podmienkach. V súčasných podmienkach ustajnenia hospodárskych zvierat, ako to uvádza Fišer (1977), nie je možné sa vyhnúť problematike kontaminácie mikroskopickými vláknitými hubami a kvasinkami.

LITERATÚRA

BILAJ, V. I.: Metody experimentalfnoj mikologii. Kiev, 1973. 233 s.
BUKOVČÁKOVÁ, M. – VOZÁR, I. – ŠROBÁROVÁ, A.: Produkcia sekundárneho metabolitu zearalenon pri niektorých druhoch rodu *Fusarium*. Biológia, 42, 1987: 733–737.

FASSATIOVÁ, O.: Plísne a vláknité houby v technické mikrobiológii. Praha, SNTL 1979. 210 s.

FIŠER, A.: Mikrobiální kontaminace velkokapacitních stájí a možnosti jejího ovlivnění aerosolovou dezinfekcí v přítomnosti zvířat. [Habilitačná práca.] Brno 1977. 176 s. – Vysoká škola veterinární.

JESENSKÁ, Z. – HAVRÁNEKOVÁ, D. – ŠAJBIDOROVÁ, I.: K problematice plesnivění některých výrobků konzervářského průmyslu. Českoslov. Hyg., 29, 1984: 102–109.
PIECKOVÁ, E. – BERNÁT, D. – JESENSKÁ, Z.: Hodnoty thermal death time pro nové termorezistentné druhy mikromycét. In: Zbor. Ref. 19. zjazd Československé společnosti mikrobiologické pri ČSAV, 1992: 39 s.

WOLF, F. A. – WOLF, F. M.: The fungi. New York 2. John Wiley a Sons Inc. 1949.

Došlo 17. 2. 1995

Kontaktná adresa:

MVDr. Anna Laciaková, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/321 11–15, fax 095/76 76 75

Názor redakční rady

Lektoři a členové redakční rady pracují pro časopis Veterinární medicína ze zájmu o udržení a zvýšení odborné úrovně časopisu. Jsme přesvědčeni, že všichni mají velký pocit odpovědnosti a uznáním je jim důvěra, s kterou jsou jim svěřovány úkoly, které pak plní mimo svoje běžné povinnosti. Pro každého z nás je radostí seznámit se s každou novou dobrou prací, kterou chtějí její autoři v našem časopise uveřejnit a kterou je možno zařadit do tisku co nejdříve bez připomínek lektorů nebo po malých úpravách a doplnění. Horší to je s rukopisy, které pro nezkušenost nebo pro neodpovědnost autorů jsou dodávány se závažnými nedostatky. Posouzení těchto prací si často vyžaduje víc času, než jim věnovali sami autoři. Uveřejnit je nelze, někdy je však škoda je zcela odmítnout a proto se pokoušíme doporučit jejich úpravu. Přináší to často víc nevědku a podráždění autorů než uspokojení na obou stranách. Není však jiná cesta, časopis si prostě nemůže dovolit uveřejnit práce, které nesplňují náročná kritéria na kvalitu příspěvků, protože by tím poškozoval jiné autory a ohrožoval svoji vlastní existenci. Přepřacování rukopisů však není povinností redakce ani lektorů. Jejich povinností není ani uvádět úplný výčet všech výhrad nebo autory přesvědčovat o oprávněnosti svého názoru. Je možné, že toto stanovisko je pro některé autory nepřijemné stejně jako

je nepřijemné to, že posuzování prací se zbytečnými nedostatky trvá dlouho. Nelze vyloučit ani to, že důsledkem namáhavého lektorování některých prací je i dlouhé posuzování prací dobrých a odpovíděně připravených. Nehodláme však změnit cíl, který si dala redakční rada a který je především v zájmu autorů: vysokou odbornou úroveň dosáhnout mezinárodního uznání časopisu Veterinární medicína. Nejlepším uznáním výsledků naší práce je zvyšující se zájem autorů a jejich pracovišť uveřejňovat kvalitní práce právě v našem časopisu. Poimoci nám i sobě, a především časopisu, mohou sami autoři, jejich spolupracovníci i nadřízení tím, že budou k sobě kritičtí, že již při přípravě pokusů budou myslet na uveřejnění výsledků, že budou pozorně studovat podobné práce z jiných pracovišť, že budou o metodikách svých pokusů a o dosažených výsledcích diskutovat nejen na svých pracovištích, ale že je budou přednášet a obhajovat na seminářích a konferencích a že jejich uveřejněním budou především sledovat cíl, který je jediným oprávněným důvodem pro vědeckou publikaci, tj. sdělení nových poznatků odborné veřejnosti přesvědčivým způsobem a v konfrontaci s poznatky již uveřejněnými. Vše ostatní, jako jsou body do osobního hodnocení, citovanost, počet vyžádaných separátů apod. musí být přirozeným důsledkem uveřejnění dobré práce, nikoliv cílem.

*Prof. MVDr. Karel Hruška, CSc.
předseda redakční rady*

POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem.

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce.

Rozsah vědeckých prací nemá přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI (ČSN 01 1300).

Vlastní úprava rukopisu má odpovídat státní normě ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojité mezery). Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Název práce (titul) nemá přesáhnout 85 úhozů. Je nutné vyvarovat se v něm obecných názvů. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

Krátký souhrn (Abstrakt) je informačním výběrem obsahu a závěru článku, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě. Je uveřejňován a měl by být dodán ve stejném jazyce jako vědecká práce.

Rozšířený souhrn (Abstract) je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je nutné jej (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

Úvod má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce realizována a velmi stručnou formou má být popsán stav studované otázky.

Literární přehled má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému. Doporučuje se co nejníž počet citovaných autorů.

Metoda se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál.

Výsledky – při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostacích a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu spolu s výsledky.

Literatura musí odpovídat státní normě ČSN 01 0197. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSČ, číslo telefonu a faxu.

Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short and a longer summary.

The author is fully responsible for the originality of his paper, for its subject and formal correctness. The author shall make a written declaration that his paper has not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper.

The paper extent shall not exceed ten typescript pages, including tables, figures and graphs.

Manuscript layout shall correspond to the State Standard ČSN 88 0220 (quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript). Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

The **title** of the paper shall not exceed 85 strokes. It is necessary to avoid in the title the usage of common expressions. Subtitles of the papers are not allowed either.

Abstract is an information selection of the contents and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes, and comprise base numerical data including statistical data. It should be submitted in English and if possible also in Czech or Slovak.

Introduction has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form.

Review of literature should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem. It is recommended to cite the lowest possible number of authors.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material.

In the section **Results** figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

Discussion contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections Results and Discussion may be presented as one section only.

The citations are arranged alphabetically according to the surname of the first author. References in the text to these citations comprise the author's name and year of publication. Only the papers cited in the text of the study shall be included in the list of references. All citations shall be referred to in the text of the paper.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code.

CONTENTS

Kudláč E., Sakour M., Čanderle J.: Metabolic profile in the periparturient period in cows with afterbirth retention and without it.....	201
Čorba J., Praslička J., Várady M., Tomašovičová O., Gašparík G.: Efficacy of moxidectin injectable (Cydectin inj.) against mixed <i>Psoroptes ovis</i> and <i>Sarcoptes ovis</i> mange in sheep.....	209
Nečas A.: Results of surgical treatment of the thoracolumbar disc disease in the dog.....	213
Páčová Z., Urbanová E.: Application of NEFERM-test to identification of psychrotrophic bacteria isolated from milk and dairy products.....	217
Benda P., Vyletěllová M.: The occurrence of <i>Staphylococcus aureus</i> in bulk milk samples.....	221
Marcin A., Fencík R., Beličková E., Siklenka P.: Dot-blot technique for quantitative detection of the wheat protein in the sausages.....	227
Laciaková A., Kočišová A., Kukučka D.: Survival of microscopic filamentous fungi under various conditions of temperature.....	233

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 40, č. 7, Červenec 1995

OBSAH

Kudláč E., Sakour M., Čanderle J.: Metabolický profil v peripartálním období u krav bez retence a s retencí sekundin.....	201
Čorba J., Praslička J., Várady M., Tomašovičová O., Gašparík G.: Účinnost moxidectinu (Cydectin inj.) na zmiešanú infekciu svrabovcami <i>Psoroptes ovis</i> a <i>Sarcoptes ovis</i> u oviec.....	209
Nečas A.: Výsledky chirurgické léčby onemocnění torakolumbálních disků u psů.....	213
Páčová Z., Urbanová E.: Uplatnění NEFERM-testu v identifikaci psychrotrofních bakterií izolovaných z mléka a mléčných výrobků.....	217
Benda P., Vyletěllová M.: Výskyt <i>Staphylococcus aureus</i> v bazénových vzorcích mléka.....	221
Marcin A., Fencík R., Beličková E., Siklenka P.: Dot-blot technika pre kvantitatívne stanovenie pšeničného proteínu v salámach.....	227
Laciaková A., Kočišová A., Kukučka D.: Prežívanie mikroskopických vláknitých húb za rôznych teplotných podmienok.....	233