

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

11

VOLUME 40 (LXVIII)
PRAHA
NOVEMBER 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. ing. Jiří Brož, CSc., Reinfelden, Switzerland

RNDr. Milan Fránek, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

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

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

M. V. Nermut, MD., PhD., Prof. emeritus, National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

Prof. MUDr. Leopold Pospíšil, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

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

Prof. MVDr. Zdeněk Věžník, 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: Agris, 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, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Den doručení rukopisu do redakce je uváděn jako datum přijetí k publikaci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze za 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: Agris, 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, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. 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).

THE EFFECT OF MONENSIN ON THE RUMEN STRAIN *ENTEROCOCCUS FAECIUM* CCM 4231

EFEKT MONENZÍNU NA BACHOROVÝ KMEŇ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* CCM 4231

A. Lauková, M. Baran, P. Siroka

Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Monensin from three different manufacturing companies (Eli Lilly Co., Indianapolis, USA; Pharmachim, Bulgaria; Spofa Prague, Czech Republic) were added to pure cultures of rumen strain *Enterococcus faecium* CCM 4231 at final concentrations 25 µg per ml and 50 µg per ml. Enterococci represent a strong bacterial group colonizing the rumen regarding to lactic acid production. *Ent. faecium* CCM 4231 is own, lactic acid-producing isolate from the rumen content of calf with a broad antimicrobial activity (bacteriocin production). This strain was obtained in the microbial preparation Inhicol to protect enteritis in young ruminants, especially. The growth of CCM 4231 strain was inhibited at both concentrations (25 µg/ml; 50 µg/ml) using all three monensins in comparison with controls (Figs. 1 and 2). The beginning of the growth inhibition was detected within 2 hours after ionophore addition. Monensin made in Bulgaria was the most effective of all when the three monensins were compared. No significant differences are found in the effect of monensins made in different production companies. Our results extend the knowledge about inhibition effect of monensin on Gram-positive bacteria, enterococci including. Moreover, the quality of monensins made by different companies is attested synchronous. In general, regarding the practical point of view, it is also contribution for the selection and application of the most suitable additives.

rumen; monensin; *Enterococcus faecium*

ABSTRAKT: V prezentovanej práci bol sledovaný účinok monenzínu od troch rozdielnych výrobcov (Eli Lilly Co., Indianapolis, USA; Pharmachim, Bulharsko; Spofa Praha, Česká republika) na čistú kultúru bachorového kmeňa *Enterococcus faecium* CCM 4231. Monenzíny boli pridávané ku testovanému kmeňu v konečnej koncentrácii 25 µg/ml a 50 µg/ml. Enterokoky predstavujú významnú bakteriálnu skupinu pri kolonizácii bachora prežúvavcov jednak z hľadiska produkcie kyseliny mliečnej, ale aj z hľadiska dusikového metabolizmu. Kmeň *Ent. faecium* CCM 4231 je vlastný izolát z bachorového obsahu teľaťa, ktorý produkuje kyselinu mliečnu a vyznačuje sa výraznou antimikrobiálnou aktivitou (produkcia bakteriocínu). Tento kmeň bol obsiahnutý aj v mikrobiálnom preparáte Inhicol, ktorý je zameraný na potlačanie enteritíd resp. na predchádzanie enteritíd najmä u mladých prežúvavcov. Rast kmeňa CCM 4231 bol inhibovaný použijúc všetky tri druhy monenzínov pri oboch koncentráciách (25 µg/ml; 50 µg/ml) v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Začiatok inhibičného účinku bol zaznamenaný už dve hodiny po pridaní ionoforu. Pri porovnaní troch monenzínov sa ako najúčinnnejší prejavil monenzín vyrobený v Bulharsku. Avšak, v účinnosti monenzínov od troch rozdielnych výrobcov neboli zaznamenané signifikantné rozdiely. Prezentované výsledky rozširujú bázu informácií o inhibičnom účinku monenzínu na gram-pozitívne baktérie, enterokoky nevynímajúc. Zároveň tiež overujú kvalitu vyrábaných aditív od rôznych výrobcov, čo z praktického hľadiska je prínosom hlavne pri výbere a aplikácii aditív.

bachor; monenzín; *Enterococcus faecium*

ÚVOD

Monenzín patrí do skupiny tzv. polyéterových antibiotík pod súhrnným označením ionofory (Presman a i., 1967). Označenie ionofory vlastne vyjadruje pôsobenie tejto skupiny antibiotík, t. j. ionofory umožňujú prenos anorganických kationov cez bunkové membrány. Westley (1977) rozdelil ionofory podľa ich schopnosti prenášať aj dvojmočné kationy na monovalentné polyétery, monovalentné monoglykozidové polyétery, divalentné polyétery a divalentné pyrolové étery. Monenzín patrí do užšej skupiny monovalent-

ných polyéterov s inhibičným účinkom hlavne na rast gram-pozitívnych baktérií (Russel a Strobel, 1989). Keďže monenzín je schopný transformovať metabolické procesy prostredníctvom bachorovej mikroflóry, a tým ovplyvňovať fermentačné procesy v bachore, jeho aplikácia je vhodná najmä vo výžive prežúvavcov výkrmovej kategórie (Baran a i., 1990). Dobré známe sú aj také pozitívne účinky monenzínu ako je redukcia tvorby metánu, produkcie amoniaku a jeho kokcidistatické účinky (Chow a Russel, 1990; Wallace a i., 1990). Navyše, monenzín zohráva dôležitú úlohu v prevencii acidóz (Dennis a i., 1981).

Kmeň *Ent. faecium* CCM 4231 je gram-pozitívny, fakultatívne anaeróbný izolát z bachorového obsahu teľafa (Lauková a i., 1993). Pre svoju širokospektrálnu antimikrobiálnu aktivitu (produkcia bakteriocínovej substance) bol tento kmeň použitý v preparáte Inhicol (Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice, Slovensko), ktorý je indikovaný na potlačenie enteritíd najmä u mláďat prežúvavcov. Vo všeobecnosti platí, že podávanie probiotík má zmysel v tom prípade, ak dané probiotikum nie je citlivé resp. je rezistentné na antimikrobiálne látky (antibiotiká či rastové stimulatory) prítomné v krmive (Marounek a i., 1990). Takže poznanie vplyvu aditíva na mikroorganizmus, t. j. testovanie jeho citlivosti či rezistencie na aditívum je základným vyšetrením. Aby sme sa vyhli kolíziám, ktoré môžu byť spôsobené diferenciami v kvalite použitého aditíva, je nevyhnutné testovanie prípravkov od viacerých výrobcov.

Preto aj cieľom tejto práce bolo sledovanie účinku monenzínu od troch rôznych výrobcov na rast čistej bakteriálnej kultúry bachorového kmeňa *Ent. faecium* CCM 4231.

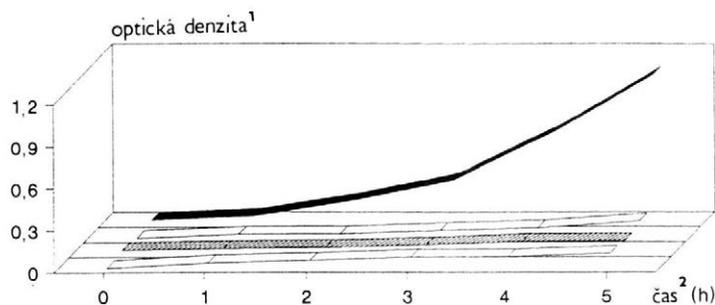
MATERIÁL A METÓDA

Monenzíny použité v experimente boli získané od troch rôznych výrobcov: Eli Lilly Co., Indianapolis, USA; Pharmachim, Bulharsko a Spofa Praha, Česká

republika. Aditíva boli rozpustené v etanole. Sterilný roztok každého z troch rozličných monenzínov v konečnej koncentrácii 50 µg/ml a 25 µg/ml bol pridaný do 100 ml Todd-Hewitt bujónu (THB, Imuna, Šarišské Michalany, Slovensko) inokulovaného 1 ml 24 h. kultúry testovaného kmeňa (OD = 1.0). Banky s bakteriálnou kultúrou a monenzínom ako aj kontroly (kultúra bez monenzínu) boli inkubované vo vodnom kúpeli (ELPAN, typ 357, Poľsko) pri teplote 37 °C. Kultivácia bola prerušená po dosiahnutí stacionárnej fázy kontrolnej vzorky. Účinok rozličných monenzínov bol testovaný šesťkrát pri oboch koncentráciách. Vzorky (2 ml) boli odoberané v pravidelných hodinových intervaloch a absorbancia bola meraná na spektrofotometri Spekol 11 (Jena, Nemecko) pri 600 nm. Čistota kultúry bola pravidelne mikroskopicky preverovaná.

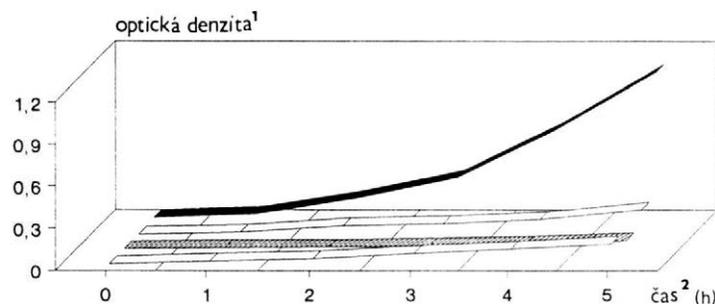
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky účinku testovania monenzínov od troch rozdielnych výrobcov na rast čistej bakteriálnej kultúry kmeňa *Ent. faecium* CCM 4231 sú na obr. 1 a 2. Naše výsledky potvrdili inhibičný účinok monenzínu od troch rôznych výrobcov na gram-pozitívny kmeň *Ent. faecium* CCM 4231 pri oboch koncentráciách, t. j. 25 µg/ml ako aj 50 µg/ml v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Efektívnejší účinok bol zaznamenaný pri použití koncentrácie 50 µg/ml. Prídavok monenzínov



1. Efekt monenzínu na rast kmeňa CCM 4231 (koncentrácia 50 µg/ml) – Effect of monensin on the growth of CCM 4231 strain (concentration 50 µg/ml)

¹optical density, ²time



2. Efekt monenzínu na rast kmeňa CCM 4231 (koncentrácia 25 µg/ml) – Effect of monensin on the growth of CCM 4231 strain (concentration 25 µg/ml)

¹optical density, ²time

- – monenzín USA – monensin USA
- – monenzín ČR – monensin Czech Republic
- ▨ – monenzín Bulharsko – monensin Bulgaria
- – kontrola bez monenzínu – control without monensin

spôsobil spomalenie rastu kmeňa CCM 4231 už 2 h. po pridaní roztoku aditíva. Rovnaký účinok monenzínu na rast bachorového kmeňa *Streptococcus bovis* ATCC 9809 aj keď za použitia vyššej koncentrácie aditíva bol publikovaný kolektívom autorov Leblanc a i. (1993). *Str. bovis* je tiež reprezentantom D-skupiny streptokokov vrátane enterokokov, ktorá kolonizuje bachor prežúvavcov. Avšak, podľa Hendersona a i. (1981) už koncentrácie monenzínov od 0,1 do 10 µg/ml vyvolali spomalenie rastu čistej kultúry kmeňa *Str. bovis* ako aj jeho úplnú inhibíciu. Aj Slyter a i. (1992) zistili inhibičný efekt monenzínu na rast čistej kultúry *Str. bovis*. Okrem toho, títo autori popísali inhibičný účinok monenzínu aj na striktno anaeróbne gram-pozitívne baktérie (*Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*). Podľa výsledkov testovania, monenzín vyrobený v Bulharsku sa prejavil ako najefektívnejší. Americkým výrobcom dodaný monenzín bol z hľadiska jeho účinnosti druhým najefektívnejším. Inhibícia rastu testovaného kmeňa bola zaznamenaná aj pri použití monenzínu dodaného českým výrobcom Spofa Praha, aj keď s najnižším inhibičným efektom. Avšak, v účinnosti monenzínov od troch rozdielnych výrobcov neboli zaznamenané významné rozdiely.

Záverom možno konštatovať, že naša štúdia potvrdzuje všeobecné informácie o inhibičnom účinku monenzínov na gram-pozitívne baktérie pri širokom koncentračnom spektre. Okrem toho, naše výsledky rozširujú rozsah poznatkov aj z hľadiska bakteriálnej skupiny enterokokov. Tieto sú totiž citlivé nielen na monenzín, ale aj na niektoré ďalšie aditíva (Lauková a i., nepublikované údaje). Zároveň sme tiež overili kvalitu vyrábaných aditív od rozdielnych výrobcov, čo je prínosom z praktického hľadiska hlavne pri výbere a aplikácii aditív.

LITERATÚRA

BARAN, M. – KALAČNĀJUK, G. I. – JALČ, D.: The effects of monensin on rumen fermentation and production characteristics of growing lambs. *Živoč. Vyr.*, 35, 1990: 753–762.

Kontaktná adresa:

MVDr. Andrea Lauková, CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésvej 4, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/362 51, fax 095/76 21 62, email: ufhsav@ccsun.tuke.sk

DENNIS, S. M. – NAGARAJA, T. G. – BARTLEY, E. E.: Effects of lasalocid or monensin on lactate-producing or using bacteria. *J. Anim. Sci.*, 52, 1981: 418–426.
HENDERSON, C. – STEWART, C. S. – NEKREP, F. V.: The effect of monensin on pure and mixed cultures of rumen bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 51, 1981: 159–169.
CHOW, J. M. – RUSSEL, J. B.: Effect of ionophores and pH on growth of *Streptococcus bovis* in batch and continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1981: 1588–1593.
LAUKOVÁ, A. – MAREKOVÁ, M. – JAVORSKÝ, P.: Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM 4231. *Lett. Appl. Microbiol.*, 16, 1993: 257–260.
LEBLANC, D. – MORIN, A. – DAIGNEAULT, J.: Comparative effect of salinomycin and monensin on *Streptococcus bovis* strain ATCC 9809. *Microbios.*, 76, 1993: 41–45.
MAROUNEK, M. – PETR, O. – ŠIMUNEK, J.: Monensin has no effect on growth and metabolism of *Megasphaera elsdenii*. *Folia Microbiol.*, 38, 1993: 383–386.
PRESSMAN, B. C. – HARRIS, E. J. – JAGGER, W. S. – JOHNSON, J. M.: Antibiotic mediated transport of alkali ions across lipid barriers. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 58, 1967: 1949–1956.
RUSSEL, J. B. – STROBEL, H. J.: Effects of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1989: 1–6.
SLYTER, L. L. – TUNG, R. S. – KUNG, L. Jr.: Effect of monensin and lysocellin on growth and fermentation by pure cultures of ruminal bacteria. *J. Appl. Anim. Res.*, 1, 1992: 1–12.
WALLACE, R. J. – NEWBOLD, C. J. – MCKAIN, N.: Influence of ionophores and energy inhibitors on peptide metabolism by rumen bacteria. *J. Agric. Sci. (Cambridge)*, 115, 1990: 285–290.
WESTLEY, J. W.: Polyether antibiotics: versatile carboxylic acid ionophores produced by *Streptomyces*. *Advanc. Appl. Microbiol.*, 22, 1977: 177–223.

Došlo 5. 12. 1994

VĚDA, INFORMACE A NÁRODNÍ ROZVOJ

Ústav zemědělských a potravinářských informací uspořádal v polovině září 1995 spolu se Státním zdravotním ústavem seminář na téma *Věda, informace a národní rozvoj*, jehož iniciátorem byla mezivládní organizace CAB International. Cílem semináře bylo seznámit účastníky s informačními produkty a vědeckými službami CABI a vytvořit předpoklady pro jednání o případném členství České republiky v této organizaci, z něhož vyplývají slevy při nákupu informačních produktů a při využívání vědeckých služeb a další členské výhody.

CAB International je nevýdělečná, převážně soběstačná, mezivládní organizace, kterou vlastní a řídí jednotlivé členské vlády. V současné době je členy této organizace 38 zemí. Hlavní základna CABI je ve Velké Británii; její regionální pobočky a vědecká pracoviště však působí i v jiných částech světa. Tato organizace plní své poslání tím, že poskytuje vědecké a informační služby orientované na zemědělství a lesnictví, na ochranu životního prostředí, na zachování a vhodné využití různorodosti rostlinných a živočišných druhů a na zlepšení výživy a zdraví lidí na celém světě.

CABI vytváří unikátní bibliografické databáze zaměřené na zemědělství a příbuzné obory, výživu a lidské zdraví. Šíří tiskem i elektronicky informace obsažené v těchto databázích, vyvíjí nejnovější elektronické informační systémy a produkty a vydává knihy a další publikace. V rámci projektu řízení informačního systému poskytuje rady a praktickou pomoc: školení pro informační pracovníky se konají buď ve Velké Británii, nebo v zahraničí.

Čtyři vědecké ústavy CABI – Mezinárodní ústav pro biologickou ochranu rostlin, Mezinárodní mykologický ústav, Mezinárodní parazitologický ústav a Mezinárodní entomologický ústav – se specializují na vymezení a objasnění vztahů mezi organismy; poskytují služby, které usnadní identifikaci těchto organismů; nabízejí diagnostické a konzultační služby; podporují programy ochrany proti škůdcům a biologické kontroly škodlivých organismů a poskytují školení vědeckým pracovníkům.

Každá členská země CABI získává výhody, které spočívají ve snížení cen publikací a služeb (v současné době o 20 %); má přednostní přístup k službám CABI a školicím projektům a má možnost vytvářet výzkumné programy ve spolupráci s ústavem CABI; získává přístup k externím fondům; může provádět kontrolu způsobu řízení a práce této organizace; může využívat služeb CAB k plnění svých povinností v rámci mezinárodních dohod a má možnost zúčastňovat se rozvojových programů CABI. Členské příspěvky jednotlivých zemí tvoří 3 % celkového rozpočtu CABI; zbývající náklady pokrývá CABI prodejem publikací a služeb, ze smluvních vědeckých výzkumů a projektů a z dalších zdrojů.

Česká republika využívá služeb CABI po dlouhou řadu let. Zemědělská knihovna, která je nyní součástí Ústavu zemědělských a potravinářských informací, začala odebírat první referátový časopis CABI dokonce již v roce 1920. Tato knihovna zpřístupňuje prostřednictvím svých fondů uživatelům informace, které CABI zpracovává. Také další instituce, především knihovny vysokých škol, objednávají a využívají informační produkty CABI, v poslední době především kompaktní disky. Informace, které CABI zpracovává, je možné rovněž využívat v dialogovém režimu napojením na databázová centra, mimo jiné i prostřednictvím sítě Internet.

V roce 1988, kdy se členství v CABI otevřelo i pro nečlenské země Britského společenství národů, vstoupilo do této organizace Maďarsko. V důsledku poskytovaných členských slev stoupl v Maďarsku nákup informačních produktů CAB International, v poslední době především báze dat CABI na CD-ROM. Došlo i k rozvoji spolupráce ve vědecké oblasti, která se projevuje především v organizování společných seminářů.

Členové CABI formálně vyzvali Českou republiku, aby se stala další členskou zemí. Členské země CAB International platí členské příspěvky, které jsou stanovovány na základě vzorce OSN. Principem příspěvku pro CABI a slev vyplývajících z členství je, že členský příspěvek je hrazen ze státních prostředků a výhody z členství získávají jednotlivé instituce na území dané země. Výhoda členství je úzce spojena s mírou nákupu a využívání informačních produktů a služeb CABI.

Závěry semináře a následný průzkum rozsahu využívání informačních produktů a vědeckých služeb CABI v České republice mají pomoci pracovníkům Ministerstva zemědělství i dalších resortů při rozhodování o tom, zda doporučit vstup České republiky do CABI.

THE EFFECT OF CARBIMASOLE ON THE ACTIVITIES OF LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES AND CONCENTRATIONS OF THYROID HORMONES IN SHEEP

EFEKT KARBIMAZOLU NA IZOENZÝMY LAKTÁTDEHYDROGENÁZY A KONCENTRÁCIE TYREOIDEÁLNYCH HORMÓNŮV U OVIEC

I. Šutiaková¹, E. Bekeová¹, V. Šutiak²

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

²University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The oxidative processes in the organism are activated by hormones of the thyroid gland. The pyruvate-lactate component catalyzed by lactate dehydrogenase presents one of the important oxidic-reductive systems in the animal organism of biochemical importance (EC. 1.1.1.27). In certain cases of the thyroid gland disturbances antithyroid drugs, such as derivatives of thiouracil, mercaptoimidazole and some others may be used for the treatment of men and animals (Marchant et al., 1979; Negwer, 1987). In the present study, the activity changes of lactate dehydrogenase isoenzymes in the blood plasma of young rams and ewe hoggets in experiments with carbimasole [carbimasolum(1-carbaethoxy-3-methyl-2-thioimidazolium)] have been studied. The dose of carbimasole at the time of sampling (May, 1993) was 70 mg per animals and day. In May, no significant differences in T₃ and T₄ concentrations in the serum of experimental and control animals in males and females were found (Tab. I). The T₃ concentrations in the experimental group of young rams were 0.56 ± 0.21 nmol/l ($n = 3$), in ewe hoggets 0.70 ± 0.19 nmol/l ($n = 6$). The T₄ concentrations in young rams were 39.15 ± 24.15 nmol/l ($n = 3$), in ewe hoggets 48.6 ± 15.3 nmol/l ($n = 6$). Out of lactate dehydrogenase isoenzymes, only LD₄ exhibited significant differences ($P < 0.02$) in the blood plasma of ewe hoggets (Tab. I). In the course of these months, no clinical signs of hypothyrosis were observed in experimental animals.

carbimasole; lactate dehydrogenase isoenzymes; thyroid hormones; ewe hoggets; young rams

ABSTRAKT: V práci sme sledovali aktivity izoenzýmov laktátdehydrogenázy v krvnej plazme 16-mesačných barančekov a jahničiek po podaní karbimazolu. Dávka karbimazolu v čase odberu vzoriek bola 70 mg/kus/deň. V máji iba izoenzým LD₄ vykazoval signifikantné rozdiely aktivity ($P < 0.02$) v krvnej plazme jahničiek. Okrem toho sme vyšetrovali aj koncentrácie tyreoidálnych hormónov v krvnom sére barančekov a jahničiek. Koncentrácie T₃ v experimentálnej skupine barančekov boli 0.56 ± 0.21 nmol/l ($n = 3$) a jahničiek 0.70 ± 0.19 nmol/l ($n = 6$). Koncentrácie T₄ u barančekov boli 39.15 ± 24.15 nmol/l ($n = 3$) a jahničiek 48.6 ± 15.3 nmol/l ($n = 6$). Počas tohto mesiaca sme nepozorovali u pokusných oviec klinické príznaky hypotyreózy.

karbimazol; izoenzýmy laktátdehydrogenázy; tyreoidálne hormóny; jahničky; barančky

ÚVOD

Pri niektorých poruchách funkcie štítnej žľazy ľudí a zvierat sa využívajú pre terapiu vytypované antityreoidálne látky, ako deriváty tiouracilu a merkaptimidazolu a iné (Marchant a i., 1979; Negwer, 1987). Antityreoidálna látka (strumigén) Carbimazol Slovakofarma tbl. zo skupiny tiokarbamidov, je derivátom metimazolu, na ktorý sa v organizme biotransformuje, zabraňuje biosyntéze hormónov v štítnej žľaze. Účinok jednej dávky (30 mg) pretrváva viac ako 24 hodín. Účinná látka prechádza placentárnou bariérou a prestupuje do materského mlieka (Anonymus, 1992). Okrem primárneho účinku týchto látok na organizmus boli zistené aj vedľajšie vplyvy na enzýmy,

imunitný systém, atď. (Bray a Hildreth, 1967; Wartofsky, 1993; Volpé, 1994).

Pri sledovaní účinku rôznych xenobiótík na tkanivá a bunkové systémy sú enzýmové štúdie stále aktuálne (Šutiak a i., 1981; Matsuzawa, 1992; Braun a i., 1993; Fossai a i., 1994).

Cieľom našej práce bolo sledovať dlhodobý vplyv karbimazolu na aktivity izoenzýmov LD a na koncentrácie TH v krvnom sére oviec.

MATERIÁL A METÓDY

Zvieratá: Sledovania sme robili na ovciach. Použili sme 10 jahničiek, ktorých hmotnosť sa pohybovala od

33 do 36 kg a šesť barančekov plemena merino, ktorých hmotnosť bola od 31 do 42 kg, vo veku 16 mesiacov. Bahnice – matky boli chované v bežnom úžitkovom chove, v ovčinci klasického typu na hlbokjej podstielke. Krmené boli podľa normy (ČSN 46 7070) pre dojčiacie bahnice. Matkám sme tri týždne pred očakávaným pôrodom podávali karbimazol, (Carbimazol Slovakofarma tbl. s obsahom 5 mg carbimazolium (1-carbaethoxy-3-methyl-2-thioimi-dazolinum) v tablete, a to v dávke 50 mg/kus/deň. Pôrody prebiehali od 21. 1. do 31. 1. 1992. Matky pokusných a kontrolných zvierat pochádzali z tej istej lokality (oblasť Moldavy), ale z rôznych hospodárskych dvorov. Ako pokusné, tak aj kontrolné zvieratá sme vybrali náhodne.

Jahničkám a barančekom, ktoré sa narodili z týchto matiek sme podali karbimazol od prvého dňa po narodení postupne vo zvyšujúcich sa dávkach. Do 14. dňa veku sme im *per os* podávali karbimazol 5 mg/kus/deň. Potom od 14. dňa sme im dali dávku 10 mg/kus/deň. Dávka karbimazolu sa im postupne zvyšovala, takže v čase odberu krvných vzoriek (máj 1993) predstavovala 70 mg/kus/deň.

Krv sme odoberali v určitých časových intervaloch medzi 8. a 10. hodinou ráno, z *vena jugularis* do heparínu (15 m.j./ml). Krvnú plazmu sme získali centrifugáciou počas 15 minút pri 190 g. Biologický materiál sme spracovali do 24 hodín. Celkovú aktivitu LD sme stanovili spektrofotometricky Sevatestom LD (Imuna š. p., Šarišské Michalany). Izoenzýmy LD sme separovali na 5,5% polyakrylamidovom géli podľa Dietza a Lubrana (1967). Na kvantitatívne vyhodnotenie izoenzymov sme použili denzitometer DS 90 s riadiacim a vyhodnocovacím programom Denzito (Mikro LaAp).

TH sme v krvnom sére stanovili rádioimunologickými metódami pri použití komerčných súprav RIA-test T_4 a RIA-test T_3 (ÚRVJ, Košice). Intra-assay s koeficientom variácie (C.V.) 4,3 % bol zistený z 10 vzoriek s koncentráciou $1,45 \pm 0,08$ nmol/l. Inter-assay s C.V. 5,7 % bol zistený z 10 vzoriek s koncentráciou $1,42 \pm 0,09$ nmol/l. Intra-assay s C.V. 3,3 % bol zisťovaný z 10 vzoriek s priemernou koncentráciou $105 \pm 3,5$ nmol/l. Inter-assay s C.V. 4,1 % bol určený z 10 vzoriek s priemernými koncentraciami $106 \pm 4,4$ nmol/l. Citlivosť testu bola 0,15 nmol/l. Výsledky sme spracovali štatisticky u kontrolných a pokusných zvierat, pričom výsledky uvádzame ako aritmetické priemery a smerodatné odchýlky. Signifikantnosť výsledkov medzi kontrolnými a pokusnými skupinami sme vypočítali Studentovým *t*-testom.

VÝSLEDKY

Pri pokusoch s karbimazolom (tab. I), v máji neboli významné rozdiely medzi kontrolnými a pokusnými skupinami v celkovej aktivite LD v krvnej plazme oboch pohlaví. Naproti tomu sme zaznamenali štatisticky významné rozdiely ($P < 0,02$) v percentuálnom za-

stupeň aktivity izoenzymu LD4 v krvnej plazme jahničiek. Koncentrácie T_3 v pokusnej skupine barančekov boli $0,56 \pm 0,21$ nmol/l a v kontrolnej skupine $1,36 \pm 0,36$ nmol/l, u jahničiek $0,70 \pm 0,19$ nmol/l a v kontrolnej skupine $1,08 \pm 0,48$ nmol/l. Koncentrácie T_4 u barančekov boli v rozsahu 39,15 \pm 24,15 a jahničiek 48,6 \pm 15,3 nmol/l. V kontrolnej skupine barančekov koncentrácie T_4 boli 52,7 \pm 6,7 nmol/l a jahničiek 63,2 \pm 10,1 nmol/l.

DISKUSIA

Antityreoideálne látky inhibujú syntézu TH tým, že blokujú jodáciu na molekule tyrozínu (Burrow, 1993). Účinky antityreoideálnych látok možno však aj urýchliť. Ako príklad možno uviesť v praxi známe urýchľovanie pôsobenia karbimazolu chlorigénom (Anonymus, 1992). Periférny účinok týchto látok *in vivo* a *in vitro* je spojený so znížením biologickej účinnosti tyroxínu na metabolickú rýchlosť a oxidačné enzýmy (Oppenheimer a i., 1972; Wartofsky, 1993). My sme v našej práci sledovali vplyv karbimazolu na aktivity izoenzymov LD a koncentrácie TH v krvnom sére oviec. Koncentrácie TH v pokusnej skupine oviec oboch pohlaví kolísali na hraniciach referenčných hodnôt, ale pri ich dolnej medzi. Fyziologické rozpätie koncentrácie TH v krvnom sére oviec sa pohybuje pre T_3 : 0,7–4,0 nmol/l a T_4 : 45–96 nmol/l, ale ja značná individuálna variabilita (Bekeová a i., 1989). Koncentrácie T_4 v krvnom sére zvierat okrem liečiv (čo predpokladáme v našich pokusoch), môže ovplyvniť vek, výživa, klimatické podmienky, estrálny cyklus a sezónne kolísanie (Webster a i., 1991; Sojka, 1993). V experimentálnej práci sme sledovali aktivity izoenzymov LD v krvnej plazme jahničiek a barančekov, ktoré sa narodili z matiek a ktorým bol dlhodobo podávaný karbimazol. Zaznamenali sme významné rozdiely iba v percentuálnom zastúpení aktivity izoenzymu LD4 ($P < 0,02$) v krvnej plazme jahničiek. Aj u oviec izoenzymy LD4 a LD5 sa nachádzajú v tkanivách, ktoré umožňujú rýchlu akumuláciu laktátu, kde prebieha anaerobná glykolýza, napríklad kostrové svalstvo (Beatty a Doxey, 1983). Izoenzýmy LD sú veľmi dôležité pre fyziológiu svalov, pretože pomocou pozitívneho a negatívneho „feedback“ mechanizmov zabezpečujú optimálny pomer koenzýmov NAD a NADH v svalových tkanivách (Markert, 1984). Kostrové svalstvo je jedno z najviac citlivých tkanív ku účinku TH (van Dorn a i., 1985). V máji hodnoty aktivít ostatných izoenzymov boli v intervaloch ako ich uvádzame v predchádzajúcich experimentálnych štúdiách (Šutiaková a i., 1993).

V pokusoch tohto smeru i naďalej pokračujeme, pretože nás zaujíma vzájomný vzťah medzi metabolickými hormónmi a izoenzymami LD po dlhodobom podaní karbimazolu ovciam.

I. Aktivity izoenzýmů laktátdehydrogenázy a koncentrace tyreoidálních hormonů při pokusech s karbimazolom u jahňat – Activities of lactate dehydrogenase isoenzymes and concentrations of thyroid hormones in experiments with carbimazole in lambs

				Krvné sérum ⁵		Krvná plazma ⁶					
				T ₃ (nmol/l)	T ₄ (nmol/l)	Celková aktivita LD ⁷ (μkat/l)	LD1	LD2	LD3	LD4	LD5
							%	%	%	%	%
Máj ¹ vek 16 mesiacov ²	barančeky ⁴	kontrolná skupina ⁸	∅ hodnota ¹⁰	1,36	52,7	22,9	47,5	10,06	33,2	3,2	5,96
			± s	0,38	6,7	9,5	11,5	1,04	7,7	0,35	5,37
			n	3	3	3	3	3	3	3	3
		pokusná skupina ⁹	∅ hodnota	0,56	39,15	18,2	52,4	11,66	24,6	5,43	5,9
			± s	0,21	24,15	9,8	2,4	3,15	2,23	1,97	1,5
			n	3	3	3	3	3	3	3	3
				P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	jahničky ³	kontrolná skupina	∅ hodnota	1,08	63,2	17,4	57,3	8,1	27,0	3,02	4,6
			± s	0,48	10,1	1,4	7,8	0,9	6,6	0,53	1,1
			n	4	4	4	4	4	4	4	4
		pokusná skupina	∅ hodnota	0,70	48,6	21,2	52,3	8,96	27,8	5,6	5,8
			± s	0,19	15,3	2,9	7,0	1,15	6,2	1,4	2,8
n			6	6	6	6	6	6	6	6	
			P	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,02	>0,05	

¹may, ²16 months of age, ³ewe hoggets, ⁴young rams, ⁵blood serum, ⁶blood plasma, ⁷total LD activity, ⁸control group, ⁹experimental group, ¹⁰average value

LITERATÚRA

- ANONYMUS 1992: Vademecum českých a slovenských farmaceutických prípravků. Praha, Spofa (Pharmaceutica) 1992: 119–120.
- BEKEOVÁ, E. – KRAJNÍČÁKOVÁ, M. – ELEČKO, J. – HENDRICHOVSKÝ, V. – MARAČEK, I.: Changes in 17 β -estradiol concentrations in dependence on changes in thyroxine (T_4) a triiodothyronine (T_3) concentrations during the reproductive cycle in sheep. In: BOŇA, K. (ed.): Endocrinology of farm animals. Proc. IInd Int. Symp. on farm animal endocrinology. Smolenice, Czechoslovakia, March 1989: 129–134.
- BEATTY, E. M. – DOXEY, D. L.: Lactate dehydrogenase and creatine kinase isoenzyme levels in the tissues and serum of normal lambs. Res. Vet. Sci., 35, 1983: 325–330.
- BRAUN, J. P. – AKTAS, M. – LEFEBVRE, H. – RICO, A. G. – TOUTAIN, P. L.: Clinical enzymology for the assessment of organ damage: Interspecific differences. Comp. Haematol. Int., 3, 1993: 27–32.
- BRAY, G. A. – HILDRETH, S.: Effect of propylthiouracil and methimazole on the oxygen consumption of hypothyroid rats receiving thyroxine or triiodothyronine. Endocrinology, 8, 1967: 1018–1020.
- BURROW, G. N.: Thyroid function and hyperfunction during gestation. Endocrin. Rev., 14, 1993: 194–202.
- DIETZ, A. A. – LUBRANO, T.: Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis. Anal. Biochem., 20, 1967: 246–257.
- FOSSI, M. C. – LEONZIO, C. – PEAKALL, D. B.: The use of nondestructive biomarkers in the hazard assessments of vertebrate populations. In: FOSSI, M. C. – LEONZIO, C. (eds.): Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. Lewis, Publ. 1994: 3–28.
- MARCHANT, B. – LEES, J. F. H. – ALEXANDER, W. D.: Antithyroid drugs. In: HERSHMAN, J. M. – BRAY, G. A. (eds.): The Thyroid Physiology and Treatment of Disease. 1979: 209–252.
- MARKERT, C. L.: Lactate dehydrogenase, biochemistry and function of lactate dehydrogenase: Cell Biochem. Function, 2, 1984: 131–134.
- MATSUZAWA, T.: Present status of animal clinical pathology examinations in the Japanese Pharmaceutical Manufacture Association. Toxicol. Pathol., 20, 1992: 528–533.
- NEGWER, M.: Organic-chemical drugs and their synonymus. 6th Revised and Enlarged Ed., Vol. I–III. Berlin, Akademie Verlag 1987. 2469 s.
- OPENHEIMER, J. H. – SCHWARTZ, H. L. – SURKS, M. I.: Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine. An explanation of the antithyroxine effect of propylthiouracil and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone. J. Clin. Invest., 51, 1972: 2493–2497.
- SOJKA, J.: Factors which affect serum T_3 and T_4 levels in the horse. Equine Pract., 15, 1993: 15–22.
- ŠUTIÁK, V. – VODRÁŽKA, J. – ANDREJKOVÁ, V.: Antihelmintiká - Sledovanie niektorých fyzikálno-chemických vlastností tribromsalánu a oxyklozanidu, stanovenie cytochrómu P_{450} v mikrozómoch pečene morčiat a P_{420} vo *Fasciola hepatica* a vplyv oboch antihelmintík na transaminázy. Biol. Chem. Vet. (Praha), XVII, (XXIII), 1981: 369–382.
- ŠUTIÁKOVÁ, I. – DALLIOVÁ, K. – ŠUTIÁK, V. – PIJÁKOVÁ, N.: Izoenzýmy laktátdehydrogenázy u plemenných oviec a barančekov. Vet. Med. – Czech, 38, 1993: 609–617.
- VAN DOORN, J. – ROELFSEMA, F. – VAN DER HEID, D.: Concentrations of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine at 34 different sites in euthyroid rats as determined by an isotopic equilibrium technique. Endocrinology, 117, 1985: 1201–1208.
- VOLPÉ, R.: Evidence that the immunosuppressive effects of antithyroid drugs are mediated through actions on the thyroid cell, modulating thyrocyte-immunocyte signaling: A review. Thyroid, 4, 1994: 217–223.
- WARTOFSKY, L.: Has the use of antithyroid drugs for Graves' disease become obsolete? Thyroid, 3, 1993: 335–344.
- WEBSTER, J. R. – MOENTER, S. M. – WOODFILL, C. J. J. – KARSCH, F. J.: Role of thyroid gland in seasonal reproduction. II. Thyroxine allows a season specific suppression of gonadotropin secretion in sheep. Endocrinology, 129, 1991, 176–183.

Došlo 28. 3. 1995

Kontaktná adresa:

RNDr. Irena Šutiáková, CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Škultétyho 3, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/622 00 74, fax 095/318 52–53

THYROID AND OVARIAN HORMONES IN EWES TREATED WITH GESTAGEN AND PMSG IN SPRING

HORMÓNY ŠTÍTNEJ ŽLAZY A VAJEČNÍKA U BAHNÍC OŠETRENÝCH GESTAGÉNNI A PMSG V JARNOM OBDOBÍ

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

Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Recent experimental observations have shown that the thyroid gland plays a dominant part in the induction and maintenance of anoestrus in ewes. The mechanisms of the anoestrous effects of the thyroid gland are still unclear. On the basis of experiments, in which after thyroidectomy at the onset of sexual activity LH production was maintained also during the spring months, iodothyronines have been supposed to stimulate the inhibitory effects of oestrogens upon the neuroendocrine centres that generate pulsatile LH secretion (Moenter et al., 1991; Webster et al., 1991). However, in our previous work (Bekeová et al., 1995) we observed significant changes in iodothyronine levels, mainly T_3 , in ewes treated with FSH, LH-RH and oxytocin-based preparations in 24 and 72 h after parturition in the spring. Having made the above observations we suppose seasonal anoestrus to result rather from changes in thyroid and ovarian hormone interactions or from a decrease in thyroid hormone levels that is induced by a temporary decrease in sexual hormones in this phase of the year. Within investigations into the effects of thyroid hormones and their interactions in spring this study focused on the response of the thyroid gland and ovaries in anoestrous ewes to chlorsuperlutin and PMSG treatment in the second half of May. Eighteen Slovak Merino ewes were divided into an experimental and a control group counting 15 and 3 animals, respectively. The experimental animals were each treated with 20 mg chlorsuperlutin (Agelin Spofa vaginal inserts) for 12 days. On day 12 the inserts were removed and each animal was given 500 IU PMSG. In the same time intervals the controls were treated with a placebo (sterile polyurethane, saline). Blood samples were obtained prior to swab insertion (day 0) and in 4-day intervals under chlorsuperlutin treatment (days 4, 8 and 12). For the first 24 h after PMSG-treatment blood samples were taken in 2-hour intervals and then in 48 and 72 h. For radioimmunological determination of T_4 , T_3 , E_2 and P_4 levels the RIA-test- T_4 , RIA-test- T_3 , RIA-test-Estra and RIA-test-Prog commercial kits (manufacturer: URVJT Košice, Slovak Republic) were used, respectively. When compared to the almost constant but significantly lower T_4 values in the controls ($P < 0.05$; $P < 0.01$; Tab. II, Fig. 1), a repeated massive release of T_4 occurred in the experimental animals (Tab. I, Fig. 1). Its first peak observed 4 h after PMSG was significant in comparison both to Day 0 and the controls ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). The same was true for the 2nd peak observed 20 h after PMSG-treatment ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively). The dynamics of T_3 was similar in both groups. The transitory increase in T_3 levels observed in the controls (Tab. II, Fig. 2) on day 4 of chlorsuperlutin treatment was insignificant when compared to day 0. Both the decrease observed between day 8 of chlorsuperlutin treatment and 20 h after PMSG gavage, and the increase between 24 and 72 h appeared to be insignificant. Comparison to day 0 revealed increased T_3 levels in the experimental group (Tab. I, Fig. 2) on days 4 and 8 of chlorsuperlutin treatment, the levels of significance being $P < 0.01$ and 0.05, respectively. Between 8 and 24 h after PMSG-gavage, in contrast to the controls, T_3 levels in the experimental animals acquired the character of a slowly increasing rhythmic pulsation. At 72 h after PMSG a significant decrease occurred ($P < 0.05$). In the control animals (Tab. II, Fig. 3) E_2 levels revealed interchanging episodes of insignificant increase and decrease beneath test sensitivity. In the experimental ewes (Tab. I, Fig. 3) a double-peaked elevation of E_2 could be observed, the first (insignificant) peak occurring 18 and 20 h and the second (significant) one 48 and 72 h following PMSG treatment ($P < 0.05$ and 0.01, respectively). The inter-group differences were significant at the level of $P < 0.05$ in each case. P_4 levels in the controls (Tab. II, Fig. 4) ranged within 1.2 and 3.4 nmol/l serum, except of a decrease in 10 and 48 h that was insignificant when compared to day 0. In the experimental ewes (Tab. I, Fig. 4) P_4 levels revealed a gradual decrease, reaching their lowest values (significant in comparison to Day 0 at the level of $P < 0.001$) between 22 and 24 h after PMSG treatment. Comparison to the controls revealed the lowest P_4 values to occur between 12 and 20 h after PMSG-treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$; $P < 0.001$). The changes in both iodothyronine levels that could be observed after chlorsuperlutin and PMSG treatment were partly different from those published by Moenter et al. (1991) and Webster et al. (1991). In agreement with the above authors we suppose the changes in thyroid and ovarian hormone interactions to be the cause of seasonal anoestrus induction and maintenance. On the basis of the obtained results we suppose that the depression of the secretion of iodothyronines is the basic mechanism responsible for the onset of the seasonal anoestrus as well as for its duration. We suppose that the changes in the secretion of sexual hormones as well as their controlling elements in spring are responsible for the decreased activity of the thyroid gland.

ewes; anoestrus; chlorsuperlutin; PMSG; thyroxine; triiodothyronine; oestradiol 17- β ; progesterone

ABSTRAKT: Sledovali sme dynamiku a koncentrácie tyroxínu (T_4), trijódtyronínu (T_3), 17 beta-estradiolu (E_2) a progesterónu (P_4) u anestrických bahnič plemena slovenské merino po ich ošetrovaní chlórsuperlutinom a PMSG (pokusná skupina, $n = 15$) v druhej polovici mája. Kontrolným bahničiam ($n = 3$) sme podávali placebo. Odber vzoriek krvi punkciou v. *jugularis* sme počas pôsobenia chlórsuperlutinu robili v 4-dňových intervaloch po podaní PMSG v 2-hodinových a v 24-hodinových intervaloch. Koncentrácie T_4 , T_3 , E_2 a P_4 sme stanovili rádioimunologicky súpravami RIA-test- T_4 , RIA-test- T_3 , RIA-test-ESTRA, RIA-test-PROG (ÚRVJT, Košice). Koncentrácie T_4 u pokusných bahnič boli v porovnaní ku kontrolám, s výnimkou 4. a 8. dňa, 12., 14., 18., 48. a 72. hodiny signifikantne vyššie ($P < 0.05$; $P < 0.01$). Ich najvyššie hodnoty, v porovnaní k 0. dňu a kontrolám signifikantne, sme zistili za 4 h ($P < 0.01$; $P < 0.05$) a 20 h ($P < 0.001$ a $P < 0.01$) po podaní PMSG. Koncentrácie T_3 u kontrol sa signifikantne nemenili. V pokusnej skupine sme v 4. a 8. dni pôsobenia chlórsuperlutinu zaznamenali v porovnaní k 0. dňu signifikantné zvýšenie ($P < 0.01$ a $P < 0.05$) a v 72. h po podaní PMSG v porovnaní ku kontrolám, signifikantné zníženie ($P < 0.05$) koncentrácií T_3 . Koncentrácie E_2 u kontrol v 12. dni, v 2., 4., 8., 10., 18., 20. a 22. hodine klesli pod úroveň citlivosti testu. Ich ďalšie signifikantné zmeny sme v porovnaní k 0. dňu nezistili. U pokusných bahnič sme vzostup koncentrácií E_2 , signifikantný v porovnaní k 0. dňu a kontrolám, zaznamenali za 48 h ($P < 0.05$ a $P < 0.05$) a 72 h ($P < 0.01$ a $P < 0.05$) po podaní PMSG. Najnižšie koncentrácie P_4 u pokusných bahnič, signifikantne v porovnaní k 0. dňu sme zaznamenali medzi 22. a 24. hodinou ($P < 0.001$) a v porovnaní ku kontrolám medzi 12. h a 20. h ($P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.001$). Z výsledkov predpokladáme, že základným princípom nástupu sezónnej anestríe u oviec plemena merino je depresia sekrécie jódtyronínov vyvolaná zmenami v sekrécii pohlavných hormónov a ich radiaciách zložkách v jarnom období.

bahnice; anestríe; chlórsuperlutín; PMSG; tyroxín; trijódtyronín; 17 beta-estradiol; progesterón

ÚVOD

Jedným z faktorov, ktoré sa dávajú do súvisu s nástupom sezónnej anestríe je prolaktín. Jeho signifikantne vyššie hladiny v jarnom a letnom období v porovnaní k jesenným mesiacom boli zistené u negravídnych i gravidných bahnič (Brunet a Sebastian, 1991). Stimulácia prolaktínu u cyklujúcich oviec aplikáciou TRH v preovulačnej fáze pohlavného cyklu vyvolala supresiu sekrécie estradiolu priamym vplyvom na ovária (McNeilly a Baird, 1983). V *in vitro* experimentoch prolaktín blokoval androgén-stimulačný účinok LH (Magoffin a Erickson, 1982), zvyšoval produkciu 5 alfa redukovaných androgénov (Polan a Behrman, 1981), a inhiboval aktivitu aromatázových systémov stimulovaných s FSH (Dorrington a Gore-Langton, 1982).

Podľa výsledkov prác posledných rokov sú za sezónnu anestríu oviec zodpovedné hormóny štítnej žľazy (Moenter a i., 1991; Webster a i., 1991).

Jódtyroníny podľa uvedených autorov stimulujú negatívny účinok estrogénov na neuroendokrinné štruktúry, ktoré generujú pulzatívnu sekréciu LH.

V našich experimentálnych prácach sme však zistili signifikantné zmeny v koncentráciách jódtyronínov, zvlášť T_3 , po synchronizácii ruje v jarnom období u bahnič, ktoré sme po pôrode ošetrili prípravkami na báze oxytocínu, LHRH a FSH (Bekeová a i., 1995). Na základe uvedených pozorovaní predpokladáme, že na mechanizmoch zodpovedných za nástup a dĺžku sezónnej anestríe sa spolupodieľa pokles sekrécie hormónov štítnej žľazy v popôrodnom a v jarnom období (Kesler a i., 1981; Riis a Madsen, 1985; Ross a i., 1985; Webster a i., 1991). Impulzy, ktoré pokles sekrécie jódtyronínov iniciujú, majú podľa našich predpokladov však pôvod v zmenách aktivity pohlavných orgánov a ich nadradených zložiek.

Za účelom overenia tejto hypotézy sme prácu zamerali na štúdium zmien dynamiky hormónov štítnej žľazy a vaječníka u bahnič po synchronizácii ruje kombinovaným ošetrovaním gestagénmi a PMSG v druhej polovici mája.

MATERIÁL A METÓDY

Pokusné zvieratá

Do sledovania sme zaradili 18 bahnič plemena slovenské merino z bežného úžitkového chovu. Kritériami pre výber do experimentu bol klinicky dobrý zdravotný stav, tri až štyri predchádzajúce bahnenia a posledný pôrod jedného jahňata v prvej polovici februára. Na poľnohospodárskom majetku boli zvieratá chované na pastve. Pätnásť dní pred začiatkom experimentu boli prevezené do priestorov pre experimentálne zvieratá Ústavu experimentálnej veterinárnej medicíny a rozdelené na pokusnú ($n = 15$) a kontrolnú skupinu ($n = 3$). Počas adaptácie i celého experimentu boli pokusné zvieratá držané v kotercoch po päť bahnič s priamym výbehom na pastvu. Kontrolné zvieratá boli za takých istých podmienok držané zvlášť. Okrem dennej pastvy (trvalý trávny porast na ornej pôde; 5,0 kg), kŕmna dávka pre obe skupiny obsahovala seno (0,2 kg), kŕmnu zmes pre kojacie bahnice BAK a ovos v pomere 1 : 1 (0,2 kg), minerálny líz pre ovce a vodu *ad libitum*. Kŕmna dávka zodpovedala ČSN 46 7070. Sedemnásteho mája medzi 8.00 a 9.00 h bol zvieratám inšerovaný chlórsuperlutín (Agelin Spofa, pošvové tampóny, Galena Opava) v dávke 20 mg na zviera. Po 12-dňovom pôsobení boli tampóny odstránené a zvieratám bolo *i. m.* aplikované 500 m. j. PMSG na zviera (Bioveta, Ivanovice na Hané). Kontrolné zvieratá sme v tých istých časových intervaloch ošetrili s placebo (sterilný polyuretán a fyziologický roztok).

Odber vzoriek

Krv sme odoberali punkciou v. *jugularis*, vždy medzi 8.00 a 9.00 h. Prvé vzorky sme odoberali pred inserciou tampónov (0. deň). Počas pôsobenia chlórsuperlutinu sa v odberoch pokračovalo v 4-dňových intervaloch, t. z. v 4., 8., 12. dni. Odber v 12. dni bol identický s odberom vzoriek v 0. hodine pred aplikáciou PMSG. Počas prvých 24 h po ošetrovaní zvierat s PMSG sme odoberali krv v dvojhodinových intervaloch, t. z. za 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 a 24 h. Ďalšie odbery boli vykonané za 48 a 72 h po podaní PMSG. Krvné séra získané centrifugáciou vzoriek krvi bezprostredne po odbere sme uložili pri teplote -18°C .

Laboratórne vyšetrenie

Koncentrácie tyroxínu sme stanovili rádioimunologicky, komerčným testom RIA-test- T_4 (ÚRVJT, Košice). Citlivosť testu bola menšia ako 25 nmol/l. Intra-assay s koeficientom variácie (C.V.) 3,3 % bol zisťovaný z 10 vzoriek s priemernou koncentráciou $105 \pm 3,5$ nmol/l. Inter-assay s C.V. 4,1 % bol určený z 10 vzoriek s priemernými koncentraciami $106 \pm 4,4$ nmol/l. K rádioimunologickému stanoveniu trijódtyronínu sme použili RIA-test- T_3 (ÚRVJT, Košice). Citlivosť testu bola 0,15 nmol/l. Intra-assay s C.V. 4,3 % bol zistený z 10 vzoriek s koncentráciou $1,45 \pm 0,08$ nmol/l. Inter-assay s C.V. 5,7 % bol zistený z 10 vzoriek s koncentraciami $1,42 \pm 0,09$ nmol/l. Pre rádioimunologické stanovenie 17 beta-estradiolu sme použili RIA-test-ESTRA (ÚRVJT, Košice). Citlivosť testu bola $0,025 \pm 0,006$ nmol/l. Intra-assay s C.V. 11,79 % bol určený z piatich vzoriek s priemernými koncentraciami $1,35 \pm 0,16$ nmol/l. Inter-assay s C.V. 14,2 % bol určený z ôsmich vzoriek s koncentraciami $1,26 \pm 0,18$ nmol/l. Koncentrácie progesterónu sme stanovili rádioimunologicky s použitím testu RIA-test-PROG (ÚRVJT, Košice). Citlivosť testu bola 0,5 nmol/l. Intra-assay s C.V. 13,7 % bol zistený z piatich vzoriek s priemernými koncentraciami $4,81 \pm 0,66$ nmol/l. Inter-assay s C.V. 7,48 % bol zistený z 10 vzoriek s priemernými koncentraciami $4,81 \pm 0,36$ nmol/l.

Matematicko-štatistické hodnotenie

Signifikanciu medziskupinových diferencií a diferencií medzi 0. a ostatnými dňami experimentu sme určili Studentovým *t*-testom. Miera rozptylu individuálnych hodnôt bola zisťovaná výpočtom smerodajnej odchýlky (σ).

VÝSLEDKY

Štatisticky preukazné zmeny v porovnaní k 0. dňu sme v koncentráciách T_4 u kontrolnej skupiny (tab. II, obr. 1) v priebehu celého sledovania nezaznamenali. Ich mierne zvýšenie sa dalo pozorovať medzi 12. a 18. hodinou sledovania. U pokusných zvierat (tab. I, obr. 1)

sme v porovnaní k 0. dňu pozorovali v koncentráciách T_4 opakované masívne uvoľnenie s prvým vrcholom za 4 h ($P < 0,01$) a druhým za 20 h ($P < 0,001$) po podaní PMSG. V porovnaní ku kontrolnej skupine bol vzostup koncentrácií T_4 u pokusnej skupiny v oboch časových obdobiach signifikantný ($P < 0,05$; $P < 0,01$). Signifikantnosť rozdielov medzi kontrolnou a pokusnou skupinou v ďalších sledovaných dňoch a hodinách udávame v tab. I.

V koncentráciách T_3 u kontrolnej skupiny (tab. II, obr. 2) sme v porovnaní k 0. dňu zaznamenali prechodný, štatisticky nepreukazný vzostup v 4. dni po podaní placebo. Medzi 8. dňom a 22. hodinou experimentu sa koncentrácie T_3 u tejto skupiny pohybovali pod úroveň východných hodnôt. Od 24. hodiny až do konca sledovania sa jeho koncentrácie v porovnaní k 0. dňu udržiavali na nesignifikantne zvýšených hladinách. Výrazný, v porovnaní k 0. dňu signifikantný vzostup koncentrácií T_3 u pokusných zvierat (tab. I, obr. 2) sme zaznamenali v 4. a 8. dni pôsobenia chlórsuperlutinu, ($P < 0,01$; $P < 0,05$). V porovnaní ku koncentraciam T_3 u kontrolných zvierat bol vzostup T_3 v oboch uvedených dňoch nesignifikantný. Po poklese na úroveň východných hodnôt v deň aplikácie PMSG sa tendencie ďalšieho poklesu udržiavali do 6. hodiny od podania PMSG. V časovej perióde medzi 8. a 24. hodinou mala krivka koncentrácií T_3 charakter pozvoľne sa zvyšujúcej rytmickej pulzácie. Prechodný vzostup koncentrácií T_3 zistený v 48. hodin bol v porovnaní k 0. dňu nesignifikantný. V 72. hodine sa hodnoty jeho koncentrácií pohybovali pod úrovňou východných hodnôt ($P > 0,05$). Signifikantnosť medziskupinových diferencií, s nižšími koncentraciami T_3 u pokusnej skupiny, sme zistili v 72. hodine po podaní PMSG ($P < 0,05$).

V koncentráciách E_2 u kontrolných zvierat, (tab. II, obr. 3) sme počas celého sledovaného obdobia pozorovali striedanie epizód nesignifikantného vzostupu s epizódami poklesu jeho koncentrií pod úroveň citlivosti testu. U zvierat pokusnej skupiny (tab. I, obr. 3) sa koncentrácie E_2 v 4. a 8. dni pohybovali na hladinách vyšších ako 0,5 nmol/l séra, ale v porovnaní k 0. dňu nesignifikantných. Po poklese v deň aplikácie PMSG (0. hodina) v porovnaní k 0. dňu signifikantnom ($P < 0,001$) sa na štatisticky preukazne nižších hodnotách pohybovali do 16. hodiny po aplikácii PMSG. Ich prvú, nesignifikantnú eleváciu sme zaznamenali medzi 18. a 20. h po podaní PMSG. U zvierat kontrolnej skupiny sa koncentrácie E_2 v tomto časovom rozpätí pohybovali pod úrovňou citlivosti testu. K ďalšej masívnej, v porovnaní k 0. dňu štatisticky preukaznej inkrecii 17 beta-estradiolu došlo v 48. hodine ($P < 0,05$). Tento vzostup E_2 bol signifikantný i v porovnaní ku koncentraciam E_2 u zvierat kontrolných ($P < 0,05$). Jeho najvyššie hodnoty, v porovnaní k 0. dňu signifikantné ($P < 0,01$) sme zaznamenali za 72 h po aplikácii PMSG s medziskupinovou signifikantnosťou diferencií na hladine ($P < 0,05$). Signifikantnosť medziskupinových rozdielov v ďalších dňoch a hodinách sledovania udávame v tab. I.

U zvierat kontrolnej skupiny kolísali koncentrácie P_4 (tab. II, obr. 4) takmer počas celého sledovania na hladinách s rozpätím $1,2 \pm 0,7$ až $3,4 \pm 1,7$ nmol/l séra. Ich prechodný, v porovnaní k 0. dňu nesignifikantný pokles sme pozorovali v 10. a 48. hodine po simultánom ošetrení s placebo. Koncentrácie P_4 u pokusných zvierat (tab. I, obr. 4) po štatisticky nepreukaznom vzostupe v 4. a 8. dni pôsobenia chlórsuperlutinu a signifikantnom poklese v 0. hodine ($P < 0,01$), mali charakter pozvoľného, v porovnaní k 0. dňu signifikantného poklesu ($P < 0,01$; $P < 0,001$) až do konca sledovania. Na najnižších hodnotách sa pohybovali medzi 22. a 24. hodinou po podaní PMSG ($P < 0,001$). Signifikantnosť poklesu v porovnaní ku kontrolnej skupine sme zaznamenali v časovom rozpätí medzi 12. a 20. hodinou po aplikácii PMSG ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$).

DISKUSIA

Nami pozorované zmeny E_2 a P_4 u kontrolných oviec sú porovnateľné s výsledkami autorov Yuthasastrakosolai. (1975). Autori udávajú, že periférne

koncentrácie ovariálnych steroidov sú počas anestrú nízke, avšak ich variabilné množstvá sú dostatočné na udržiavanie negatívneho feedback účinku na sekréciu LH.

Koncentrácie T_4 u kontrol v porovnaní k pokusným ovciam sa pohybovali na nižších a konštantných hodnotách. Nesignifikantný vzostup T_3 u tejto skupiny pozorovaný v 4. dni ako aj v 24., 48. a 72. hodine (odbery boli robené medzi 8.00 a 9.00 h), dávame do súvisu so zvýšenou ovariálnou aktivitou v ranných hodinách a schopnosťou E_2 stimulovať premenu T_4 na biologicky aktívny T_3 (Chen a Walfish, 1978). Fázu dňa, ako faktor významne vplyvajúci na pohlavnú aktivitu potvrdili Kolumazník a i. (1991) pri štúdiu intravaginálnej impedancie jalovic.

Kombinované ošetrenie bahnie s chlórsuperlutínom a PMSG v druhej polovici mája viedlo k štatisticky preukazným zmenám nielen v koncentráciách E_2 a P_4 ale i oboch jódytrónínov. Zmeny zaznamenané v koncentráciách T_4 sú v zhode s našimi predchádzajúcimi výsledkami (Beková a i., 1995) a podporujú hypotézu o význame sexuálnych hormónov pri spúšťaní „anestrického efektu“ štitnej žľazy u oviec. Čiastočný rozpor možno zistiť medzi našimi predpokladmi a vý-

I. Koncentrácie tyroxínu (T_4), trijódtyronínu (T_3), 17 beta-estradiolu (E_2) a progesterónu (P_4) u bahnie po navodení ruje gestagénmi a PMSG v jarom období – The concentrations of thyroxine (T_4), triiodothyronine (T_3), 17 beta-oestradiol (E_2) and progesterone (P_4) in lambing ewes after gestagen and PMSG induction of oestrus in the spring season

Doba odberu vzoriek ¹	Koncentrácie (nmol/l) – pokusná skupina ²			
	T_4	T_3	E_2	P_4
0. D	64,8 ± 11,1 ^{a*}	2,1 ± 0,5	0,9 ± 0,2 ^{a*}	6,0 ± 2,6
4. D	62,3 ± 7,8	2,9 ± 0,6 ⁺⁺	1,0 ± 0,1 ^{b*}	7,6 ± 2,6 ^{b*}
8. D	57,9 ± 10,0	2,9 ± 0,7 ⁺	0,9 ± 0,1 ^{c*}	7,8 ± 2,5
12. D = 0.h	82,0 ± 13,8 ^{b*+++}	2,1 ± 0,3	0,4 ± 0,3 ^{b*+++}	3,0 ± 1,1 ⁺⁺
2. h	88,3 ± 19,4 ^{a*+++}	1,9 ± 0,2	0,3 ± 0,2 ^{b*+++}	2,6 ± 0,9 ⁺⁺
4. h	91,5 ± 22,4 ^{a*+++}	1,8 ± 0,4	0,4 ± 0,2 ^{b*+++}	2,6 ± 0,9 ⁺⁺
6. h	87,7 ± 14,9 ^{b*+++}	1,8 ± 0,2	0,3 ± 0,2 ⁺⁺⁺	2,3 ± 0,6 ⁺⁺⁺
8. h	81,6 ± 16,6 ^{a*+++}	2,0 ± 0,4	0,2 ± 0,1 ^{b*+++}	1,0 ± 0,5 ⁺⁺⁺
10. h	72,5 ± 17,1 ^{a*}	1,9 ± 0,3	0,3 ± 0,2 ^{b*+++}	1,0 ± 0,5 ⁺⁺⁺
12. h	72,3 ± 16,8	1,8 ± 0,3	0,2 ± 0,1 ⁺⁺⁺	0,8 ± 0,6 ^{a*+++}
14. h	77,4 ± 15,1 ⁺	2,1 ± 0,3	0,4 ± 0,2 ⁺⁺⁺	0,8 ± 0,5 ^{a*+++}
16. h	79,2 ± 16,6 ^{a*++}	1,8 ± 0,4	0,2 ± 0,1 ^{a*+++}	0,6 ± 0,2 ^{c*+++}
18. h	84,4 ± 19,5 ⁺	2,0 ± 0,5	0,9 ± 0,3 ^{b*}	0,4 ± 0,1 ^{b*+++}
20. h	92,5 ± 13,7 ^{b*+++}	2,2 ± 0,3	1,1 ± 0,4 ^{b*}	0,5 ± 0,3 ^{b*+++}
22. h	87,8 ± 13,5 ^{b*++}	2,0 ± 0,2	0,3 ± 0,2 ^{b*+++}	0,3 ± 0,2 ⁺⁺⁺
24. h	86,2 ± 10,6 ^{b*+++}	2,1 ± 0,4	0,7 ± 0,2 ^{b*}	0,3 ± 0,2 ⁺⁺⁺
48. h	83,6 ± 13,0 ⁺	2,6 ± 0,6	1,2 ± 0,3 ^{a*++}	0,3 ± 0,5 ⁺⁺
72. h	66,4 ± 10,7	1,7 ± 0,5 ^{a*}	1,3 ± 0,3 ^{a*+++}	0,4 ± 0,7 ⁺⁺

Signifikantnosť diferencií sledovaných parametrov medzi 0. dňom a ostatnými dňami experimentu – Significance of differences in the investigated parameters between day 0 and other days of the experiment:

Studentov *t*-test – Student's *t*-test: + = $P < 0,05$; ++ = $P < 0,01$; +++ = $P < 0,001$

Medziskupinová signifikantnosť diferencií (Studentov *t*-test) – Between-the-groups significance of differences (Student's *t*-test):

a : $a^* = P < 0,05$; b : $b^* = P < 0,01$; c : $c^* = P < 0,001$

D = deň – day; h = hodina – hour

¹sampling time, ²concentration (nmol/l) – experimental group

sledkami a hypotézami, ktoré publikovali Nichols a i. (1988). Autori zhodne s našimi úvahami predpokladajú, že podstatným endogénnym faktorom, ktorý generuje prechod plodnej sezóny do sezónnej anestríe je štítina žľaza. Na rozdiel od našich zistení, v ktorých sme pozorovali zmeny oboch jódtyronínov po synchronizačnom ošetrení však udávajú, že estrálny cyklus môže byť zachovaný počas celého obdobia anestríe (jar, leto) u tyreoidektomovaných oviec chovaných v podmienkach stabilizovanej fotoperiody. Podobne Follett a Potts (1990) udávajú, že plodné obdobie oviec môže byť predĺžené inhibíciou syntézy T_4 . Na základe svojich pozorovaní u tyreoidektomovaných bahnič, u ktorých bola tyreoidektómia vykonaná na začiatku plodnej sezóny (jeseň), autori Webster a i. (1991), Moenter a i. (1991), La Thrun a i. (1993) predpokladajú, že sekrecia T_4 v čase pohlavnej aktivizácie je nevyhnutná pre endogénne generované zmeny v neuroendokrínnej osi, ktoré vedú k intenzifikácii negatívneho spätnoväzobného účinku estradiolu na sekreciu LH na konci plodnej sezóny. Všeobecnú platnosť tyreoidektómie pre zachovanie amplitúdy a frekvencie LH v jarom období

u všetkých sledovaných zvierat však autori jednoznačne nepotvrdili. Taktiež pokles LH u tyreoidintaktných bahnič nebol v období marca jednoznačne potvrdený u všetkých zvierat. Takto prezentovaným mechanizmom účinku jódtyronínov nie je možné vysvetliť ani nami pozorované signifikantné zmeny oboch jódtyronínov po ošetrení bahnič chlorsuperlutinom a PMSG.

Zhodne s autormi uvažujeme o tom, že v procese anestríe zohráva štítina žľaza jednu z prioritných funkcií. Avšak mechanizmus účinku vidíme skôr ako výsledok vzájomne prepojeného stimulačného a inhibičného pôsobenia medzi jódtyronínmi a ovariálnymi hormónmi ako v sezónnom, tak aj v mimosezónnom období.

Fyziologický pokles T_4 a T_3 možno pozorovať v obdobiach poklesu pohlavnej aktivity, t. z. v jarom a letnom období (Bubeník a i., 1983; Ross a i., 1985) a v popôrodnom období, nezávisle na druhu zvierat (Kesler a i., 1981; Riis a Madsen, 1985). V našich skorších prácach u dojníc (ELEČKO a i., 1985) sme zistili, že T_4 počas estrálneho cyklu podlieha značným cyklickým zmenám. Pri útlme produkcie ovariálnych hormónov a ich riadiacich zložiek sa koncentracie

II. Koncentrácie tyroxínu (T_4), trijódtyronínu (T_3), 17 beta-estradiolu (E_2) a progesterónu (P_4) u kontrolných bahnič – The concentrations of thyroxine (T_4), triiodothyronine (T_3), 17 beta-oestradiol (E_2) and progesterone (P_4) in control lambing ewes

Doba odberu vzoriek ¹	Koncentrácie (nmol/l) – kontrolná skupina ²			
	T_4	T_3	E_2	P_4
0. D	41,6 ± 17,7 ^a	2,2 ± 0,5	0,3 ± 0,3 ^a	3,4 ± 1,7
4. D	53,2 ± 7,7	2,7 ± 0,6	0,2 ± 0,3 ^b	2,2 ± 0,8 ^b
8. D	50,4 ± 11,0	1,9 ± 0,9	0,03 ± 0,03 ^c	1,7 ± 0,8
12. D = 0.h	49,3 ± 9,6 ^b	1,8 ± 0,7	0,0 ± ^b	2,9 ± 1,4
2. h	48,6 ± 7,8 ^a	1,9 ± 0,9	0,0 ± ^b	1,6 ± 0,2
4. h	47,0 ± 0,8 ^a	1,2 ± 1,0	0,0 ± ^b	2,3 ± 1,1
6. h	46,7 ± 7,4 ^b	1,5 ± 0,6	0,2 ± 0,3	1,3 ± 1,3
8. h	47,0 ± 10,1 ^a	1,4 ± 0,3	0,0 ± ^b	1,4 ± 1,4
10. h	46,2 ± 10,4 ^a	1,4 ± 0,4	0,0 ± ^b	0,4 ± 0,7
12. h	52,6 ± 12,6	1,9 ± 0,2	0,3 ± 0,3	2,0 ± 0,4 ^a
14. h	60,6 ± 7,8	1,6 ± 0,4	0,3 ± 0,3	2,2 ± 0,4 ^a
16. h	49,8 ± 6,5 ^a	1,6 ± 0,4	0,03 ± 0,05 ^a	1,9 ± 0,4 ^c
18. h	54,9 ± 3,4	–	0,0 ± ^b	1,6 ± 0,5 ^b
20. h	41,3 ± 5,8 ^b	1,5 ± 0,5	0,0 ± ^b	1,7 ± 0,3 ^b
22. h	40,8 ± 5,0 ^b	2,0 ± 1,4	0,0 ± ^b	1,5 ± 1,3
24. h	45,5 ± 8,8 ^b	3,4 ± 1,3	0,2 ± 0,3 ^b	1,2 ± 0,7
48. h	48,0 ± 12,1	2,6 ± 1,2	0,4 ± 0,4 ^a	0,6 ± 1,0
72. h	53,8 ± 15,4	3,0 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,3 ^a	2,0 ± 1,3

Signifikantnosť diferencí sledovaných parametrov medzi 0. dňom a ostatnými dňami experimentu nebola zistená – Significance of differences in the investigated parameters between day 0 and other days of the experiment was not determined

Medziskupinová signifikantnosť diferencí (Studentov *t*-test) – Between-the-groups significance of differences (Student's *t*-test):

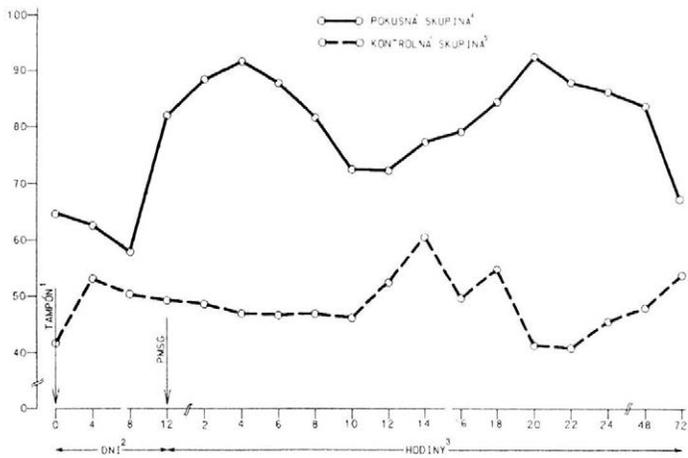
a : a* = $P < 0,05$; b : b* = $P < 0,01$; c : c* = $P < 0,001$

D = deň – day; h = hodina – hour

¹sampling time, ²concentration (nmol/l) – control group

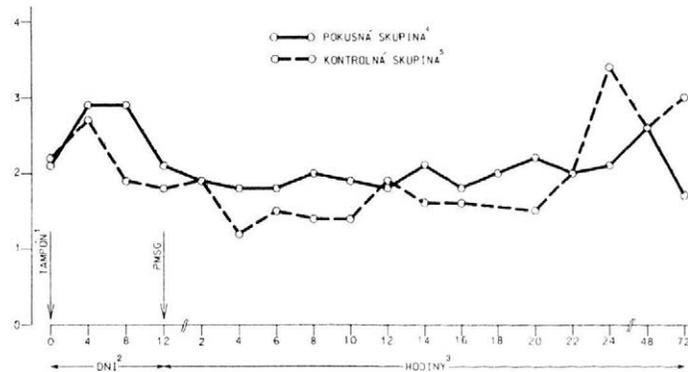
Poznámka redakce:

Statistická významnosť rozdiľ v koncentrácii estradiolu medzi pokusnou a kontrolní skupinou byla doplněna v tabulkách lektorem a autory za ni neodpovídají. U skupin s uvedeným průměrem 0,0 byla k výpočtu použita autory uvedená citlivost metody.

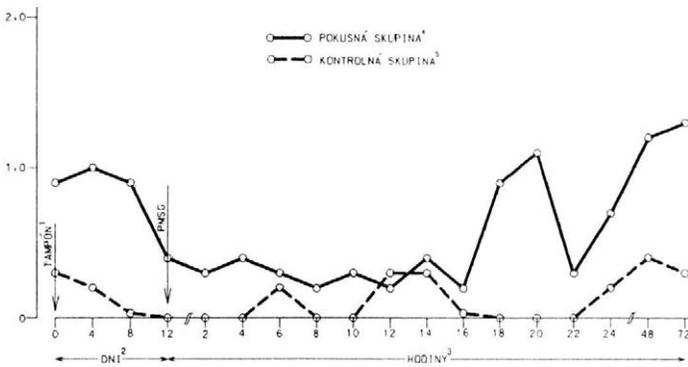


1. Koncentrácie tyroxínu – T₄ (nmol/l) u bahnie pokusnej i kontrolnej skupiny zvierat – The concentrations of thyroxine – T₄ (nmol/l) in lambing ewes of the experimental and control group

For Figs. 1–4:
¹swab, ²days, ³hours, ⁴experimental group, ⁵control group



2. Koncentrácie trijódtyronínu – T₃ (nmol/l) u bahnie pokusnej i kontrolnej skupiny zvierat – The concentrations of triiodothyronine – T₃ (nmol/l) in lambing ewes of the experimental and control group

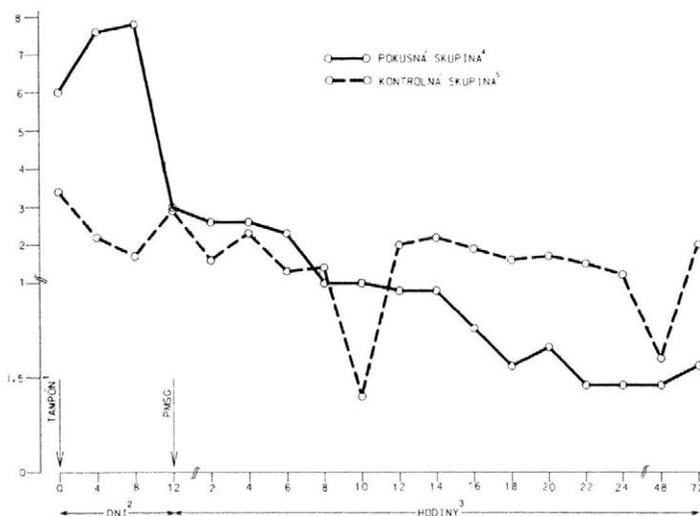


3. Koncentrácie 17 beta-estradiolu – E₂ (nmol/l) u bahnie pokusnej i kontrolnej skupiny zvierat – The concentrations of 17 beta-oestradiol – E₂ (nmol/l) in lambing ewes of the experimental and control group

trácie T₄, ako to vyplýva aj z predkladanej práce, udržiavajú na konštantných, avšak trvale nižších hodnotách. Takéto zníženie, ako sa domnievame umožňuje trvalú produkciu TRH a následne rozvinutie takých endogénnych mechanizmov, napr. zvýšenie produkcie prolaktínu, ktoré vedú k zmenám nielen v hypotalamických centrách generujúcich pulzatívnu sekreciu LH, ale aj v samotnej štítnej žľaze. Zistilo sa napríklad, že štítina žľaza opíc je schopná vyvážovať ³H dihydrotestos-

terón (Sheridan a i., 1984) a v neoplasticky zmenenej štítnej žľaze, ako aj v štítnej žľaze zmenenej vplyvom strumigénov sa zistila prítomnosť receptorov pre estrogény (Clark a i., 1985; Hiasa a i., 1991).

Podľa našich predpokladov produkty funkčne zmenenej štítnej žľazy, môžu vplyv prolaktínu zosilňovať. Odstránením štítnej žľazy môže byť inhibičný vplyv jej produktov eliminovaný. Súčasne však môže byť eliminovaný aj stimulačný vplyv jódtyronínov na syntézu



4. Koncentrácie progesterónu – P₄ (nmol/l) u bahnie pokusnej i kontrolnej skupiny zvierat – The concentrations of progesterone – P₄ (nmol/l) in lambing ewes of the experimental and control group

a produkciu pohlavných hormónov a medziproduktov ich syntézy (Wakim a i., 1987; Hayashii a i., 1987; Royo a i., 1993).

V závere, vychádzajúc z našich predchádzajúcich i súčasných pozorovaní predpokladáme, že štítina žľaza v procese navodenia anestrie a jej udržiavania hrá významnú úlohu. Avšak spustenie jej „anestrického účinku“ je pod priamou kontrolou ovariálnych steroidov a ich riadiacich zložiek.

LITERATÚRA

BEKEOVÁ, E. – KRAJNÍČÁKOVÁ, M. – HENDRICHOVSKÝ, V. – MARAČEK, I.: The effects of long-acting oxytocin, GnRH and FSH administration on thyroxine, triiodothyronin, oestradiol 17-beta and progesterone levels as well as conception rates in post-partum ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 37, 1995: 311–323.

BRUNET, A. G. – SEBASTIAN, A. L.: Effect of season on plasma concentrations of prolactin and cortisol in pregnant, non-pregnant and lactating ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 26, 1991: 251–268.

BUBENIK, G. A. – BUBENIK, A. B. – SCHAMS, D. – LEATHERLAN, J. F.: Circadian and circaneae rhythms of LH, FSH, testosterone (T), prolactin, cortisol, T₃ and T₄ in plasma mature male white-tailed deer. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76 A, 1983: 37–45.

CLARK, O. H. – GEREND, P. L. – DAVIS, M. – GORETZKI, P. E. – HOFFMAN, P. G.: Estrogen and thyroid-stimulating hormone (TSH) receptors in neoplastic and nonneoplastic human thyroid tissue. *J. Surg. Res.*, 38, 1985: 89–96.

DORRINGTON, J. – GORE-LANGTON, R. E.: Antigonadal action of prolactin: further studies on the mechanism of inhibition of follicle-stimulatory hormone-induced aromatase activity in rat granulosa cell cultures. *Endocrinology*, 110, 1982: 1701–1707.

ELEČKO, J. – BEKEOVÁ, E. – MARAČEK, I. – CHOMA, J. – KRAJNÍČÁKOVÁ, M.: Korelácia medzi tyroxínom, 17 beta-estradiolom, luteinizačným hormónom v systémovom obehu a rektálnou i vaginálnou teplotou jalovic a kráv po podaní cloprostenu. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985: 257–265.

FOLLETT, B. K. – POTTS, C.: Hypothyroidism affects reproductive refractoriness and the seasonal oestrus period in Welsh Mountain ewes. *J. Endocrin.*, 127, 1990: 103–109.

HAYASHII, M. – MARUO, T. – MATSUO, H. – MOCHIZUKI, M.: Effect of thyroid hormone on steroidogenic enzyme induction in porcine granulosa cells cultured in vitro. *Folia Endocrin.*, 63, 1987: 1231–1240.

HIASA, Y. – NISHIOKA, H. – KITAMORI, Y. – YANE, K. – NAKAOKA, S. – OHSHIMA, M. – KONISHI, N. – NISHII, K. – KITAMURA, M. – SUGIMURA, M.: Immunohistochemical detection of estrogen receptor in paraffin sections of human thyroid tissues. *Analogy*, 48, 1991: 421–424.

CHEN, H. J. – WALFISH, P. G.: Effect of estradiol benzoate on thyroid-pituitary function in female rats. *Endocrinology*, 103, 1978: 1023–1030.

KESLER, D. J. – JOHNSON, H. D. – GARVERICK, H. A.: Post-partum concentrations of thyroxine in plasma of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 64, 1981: 1618–1620.

KOLOMAZNÍK, J. – POSCHL, M. – HOŠEK, L.: Fyziologie řije u jalovic, možnosti detekce a ovlivnění reprodukčního procesu. *Živoč. Vyr.*, 36, 1991: 737–743.

LA THRUN, L. A. – DAHL, G. E. – EVANS, N. P. – KARSCH, F. J.: Involvement of thyroid hormones in the transition to anestrus in the ewe: Is there a „window“ of time that thyroid hormones act on the reproductive neuroendocrine axis? *J. Reprod. Fertil.*, 98, 1993: 30 (abstrakt).

MAGOFFIN, D. A. – ERICKSON, G. E.: Prolactin inhibition of luteinizing hormone-stimulated androgen synthesis in ovarian interstitial cell cultured in defined medium: Mechanism of action. *Endocrinology*, 111, 1982: 2001–2007.

- McNEILLY, A. S. – BAIRD, D. T.: Direct effect of prolactin induced by TRH injection on ovarian oestradiol secretion in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 69, 1983: 559–568.
- MOENTER, S. M. – WOODFILL, C. J. J. – KARSCH, F. J.: Role of the thyroid gland in seasonal reproduction: Thyroidectomy blocks seasonal suppression of reproductive neuroendocrine activity in ewes. *Endocrinology*, 128, 1991: 1337–1344.
- NICHOLS, T. J. – FOLLETT, B. K. – GOLDSMITH, A. R. – PEARSON, H.: Possible homologies between photorefractoriness in sheep and birds: the effect of thyroidectomy. *Reprod. Nutr. Dév.*, 28, 1988: 375–385.
- POLAN, M. D. – BEHRMAN, M. R.: Prolactin-stimulated ovarian androgen metabolism. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 139, 1981: 487–491.
- RIIS, P. M. – MADSEN, A.: Thyroxine concentrations and secretion rates in relation to pregnancy, lactation and energy balance in goats. *J. Endocrin.*, 107, 1985: 421–427.
- ROSS, T. T. – GOODE, L. – LINNERTUD, A. C.: Effects of high ambient temperature on respiration rate, rectal temperature fetal development and thyroid gland activity in tropical and temperature breeds of sheep. *Theriogenology*, 24, 1985: 259–269.
- ROYO, T. – HARD, D. – HEGARD, F. G.: Regulation of cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase mRNA levels by L-triiodothyronine. *Biochem. J.*, 289, 1993: 557–560.
- SHERIDAN, P. J. – MCGILL, H. C. – LISSITZKY, J. C. – MARTIN, P. M.: The primate gland contains receptors for androgens. *Endocrinology*, 115, 1984: 2154–2159.
- WEBSTER, J. R. – MOENTER, S. M. – WOODFILL, C. J. J. – KARSCH, F. J.: Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. II. Thyroxine allows a season-specific suppression of gonadotropin secretion in sheep. *Endocrinology*, 129, 1991: 176–183.
- WAKIM, N. G. – RAMANI, N. – RAO, CH. V.: Triiodothyronine receptors in porcine granulosa cells. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 40, 1987: 156–237.
- YUTHASASTRAKOSOL, P. – PALMER, W. M. – HOWLAND, B. E.: Release of LH anoestrus and cyclic ewes. *J. Reprod. Fertil.*, 50, 1975: 319–321.

Došlo 14. 4. 1994

Kontakná adresa:

MVDr. Eva Bekeová, CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/622 00 74, fax 095/318 53

THE EFFECT OF CADMIUM TREATMENT ON BREEDING HENS AND COCKS AND EARLY VIABILITY OF THEIR CHICKENS

VPLYV KADMIA NA SLIEPKY A PREŽIVATELNOSŤ MLADÝCH KURČIAT

J. Pribilincová¹, M. Maretta², I. Janotíková¹, E. Margettová²

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

²*University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic*

ABSTRACT: The effect of cadmium, with and without selenium, on breeding hens and cocks and their offspring up to 7 days of age was studied. In adult birds, the body weight, mortality rate, pathological changes and cadmium level were determined. In chicks, the mortality rate and level of cadmium were evaluated. Cadmium as cadmium chloride was orally administered to the hens at three dosages: 3 ppm, 20 ppm and 30 ppm + 4 ppm of selenium. Cadmium levels in the muscles, liver and kidneys of laying hens were analysed after 60 days and those of chicks after 30 and 60 days of the experiment. Cd determinations were conducted by the method of electrothermic atomization, using an atomic absorption spectrophotometer. Body weight in laying hens was maintained at the control level, while in cocks it slightly increased in all experimental groups. In the adult birds, no mortality occurred while 0.25–1.11% mortality was observed in chicks. The results showed a variability in cadmium levels in hens, according to the dosage applied. These levels were high in the kidneys and liver, and lower in the muscles. A non-significant increase of cadmium level was found in the liver and kidneys of chicks after the first month of application. The addition of selenium resulted in a reduction of cadmium level in the liver and kidneys of laying hens but not in the muscles. Gross pathological and histological changes in the kidneys and liver were observed in groups fed 20 ppm and 30 ppm of cadmium.

domestic fowl; chicks; cadmium; selenium

ABSTRAKT: Sledovali sme účinok kadmia aplikovaného samostatne a spolu so selénom na nosnice a ich potomstvo do obdobia 7. dňa života. U sliepok sme sledovali telesnú hmotnosť, úhyn, patologické zmeny a hladinu kadmia. U kurčiat sme sledovali úhyn a hladinu kadmia. Kadmium vo forme chloridu kademnatého bolo podávané orálne sliepkam v troch dávkach: 3 ppm, 20 ppm, 30 ppm + 4 ppm Se (Na_2SeO_3). Hladina kadmia bola zisťovaná v svalovine, pečeni a obličkách u sliepok po 60. dňoch a u kurčiat po 30. a 60. dňoch aplikácie. Pre stanovenie kadmia bola použitá metóda elektrometrickej atomizácie (PV 9390 X) s použitím absorbného spektrofotometra PU 9100. Bolo zistené, že živá hmotnosť sliepok zostala na úrovni kontrolnej skupiny, kým u kohútov sa hmotnosť čiastočne zvýšila u všetkých pokusných skupín. U dospelých jedincov nebola pozorovaná zvýšená mortalita, zatiaľ čo u kurčiat bola pozorovaná 0,25–1,11% mortalita. Výsledky ukázali rôznu hladinu kadmia počas sledovaného obdobia, pričom najvyššia hladina bola zistená v pečeni a obličkách a nízka hladina vo svalovine. Hladina kadmia v sledovaných orgánoch priamo súvisela s množstvom podávaného kadmia. U kurčiat sme zistili malé zvýšenie hladiny kadmia v obličkách a pečeni po prvom mesiaci aplikácie. Pridanie selénu malo za následok zníženie hladiny kadmia v pečeni a obličkách, ale nie vo svalovine. Patologicko-anatomické a histologické zmeny v obličkách a pečeni sme pozorovali v skupinách s vyššími dávkami kadmia.

sliepkky; kurčatá; kadmium; selén

INTRODUCTION

Cadmium (Cd) is taken into plant and animal tissues either from the soil or by the application of combined phosphoric fertilizers. Baker et al. (1979) studied cadmium transfer from sludges which were used to fertilize corn, wheat and potato fields. These agricultural produces were then utilized in animal feeds. An average of 0.20 mg/kg was reported in poultry compound feeds by Grösmann and Egels (1975), whereas the

highest concentration was 0.87 mg Cd/kg. Doyle (1977), presenting a detailed survey of the effects of low feed Cd levels on farm animals, stated that prolonged feed contamination with low Cd doses affected unfavourably the growth of the animals, and resulted in hypertension and Na retention. The effect of Cd ions on the organism becomes evident in the metabolism (Nechay and Saunders, 1977).

Pathological changes in the liver and kidneys after chronic application of cadmium were reported in va-

rious mammalian species by Aughey et al. (1984), Saygi et al. (1991), Andersen et al. (1988) and Ragan and Mast (1990). The problem of cadmium application in ducks and chickens was analysed by Mayack (1981). Cadmium toxicity in chickens was studied by Krampitz et al. (1974), Pritzl et al. (1974) while residual Cd in the meat and eggs of hens was examined by Leach et al. (1979), Sell (1975) and Gubb and Kench (1971), who also studied Cd transfer into the eggs.

The present study was designed to study toxicity and the distribution of cadmium in adult hens and cocks and their offspring up to 7 days of age after oral cadmium treatment, with and without selenium.

MATERIAL AND METHODS

Animal model

Four groups, each comprising 12 laying hens (hybrids Shaver Starcross 288, line 589) in their first year of egg-laying, and four groups of 5 cocks each (hybrids Shaver Starcross 288, line 579), were involved in this experiment.

Except for the controls, cadmium chloride (CdCl_2) and sodium selenite (Na_2SeO_3) were added as a supplement to the feed mixture NVRM. NVRM is a complete feed mixture with methionine added for high performance breeding hens. The mean feed intake for hens and cocks was 120 and 140 g per bird per day, respectively. The experimental birds were kept in three-floor cages. After the preparation period, the birds were exposed to Cd for 8 weeks. The chickens hatched in the individual groups were reared up to 7 days of age. In the experiment, the dose applied to laying hens and cocks was as follows: Group 0 = control, Group 1 = 3 ppm Cd, Group 2 = 20 ppm Cd, Group 3 = 30 ppm Cd + 4 ppm Se. Body weights of the hens and cocks were determined at the start and end of the application period. Mortality of the experimental birds and of the chicks up to 7 days of age was monitored daily.

Cadmium analysis and pathological examinations

Cadmium levels were determined in the breast muscle, liver and kidneys of laying hens and cocks at the

beginning of the experiment and after application period, when the laying hens were killed. Cadmium levels of the same organs from the 7-day-old chicks, hatched from eggs collected from laying hens, were analysed after 4 and 8 weeks of cadmium application. Cadmium levels were determined in the samples directly by the atomic absorption spectrophotometer PU 9100, using a technique of electrothermic atomization (PV 9390).

After the experiment, gross pathological and histological changes were also evaluated. Tissue samples from the analysed organs were fixed in a 10% neutral formalin and embedded in paraffin. Histological sections were stained with haematoxyline and eosine.

For statistical evaluation of the Cd levels in organs, an analysis of variance was used.

RESULTS

Body weight and mortality rate in hens and cocks

The results (Tab. I) showed that body weight in females was maintained at the control level in all experimental groups. When expressed as percentage it achieved in group 1 and 3 100% and in group 2 97.9% of the weight before treatment. In cocks, the body weight increased in all experimental groups and was identical in groups 1 and 3, (106%) while in group 2 it achieved 111.5% of the weight before treatment. No mortality of hens and cocks was noted in the course of experiment.

Level of cadmium in laying hens

Residual Cd level in the tissues of hens is reported in Fig. 1. The administration of various doses of cadmium was reflected in an increase of Cd level in organs analysed, depending on the dose of Cd applied. In group 1, receiving a low dose of cadmium, Cd level surpassed the control one and was the highest in kidney followed by liver and muscle. Both in the kidneys and liver, Cd levels were significantly higher in groups 2 and 3 than those in groups 0 and 1 ($P < 0.01$). In group 3, residual Cd levels in the liver and kidneys were lower than in group 2, but this decrease was significant ($P < 0.05$) only in the kidneys.

I. Body weights of hens and cocks after Cd treatment

Group	Hens – body weight			Cocks – body weight		
	before treatment (kg)	after treatment (kg)	%	before treatment (kg)	after treatment (kg)	%
0 – control	1.43	1.38	96.50	2.04	2.16	105.88
1–3 ppm Cd	1.58	1.58	100.00	2.10	2.24	106.66
2–20 ppm Cd	1.47	1.44	97.95	2.08	2.32	111.53
3–30 ppm Cd + 4 ppm Se	1.55	1.56	100.64	2.14	2.28	106.54

II. Mortality of 7 days old chicks after exposing laying hens and cocks to cadmium treatment

Group	Total number of chicks hatched	Total number of chicks died	Chicks died in %
0 – control	406	1	0.25
1–3 ppm Cd	400	1	0.25
2–20 ppm Cd	361	4	1.11
3–30 ppm Cd + 4 ppm Se	397	2	0.51

Pathological findings in hens

After the completion of experiment walnut-sized cysts were found in groups 1 and 2. They proved to be aqueous cysts localized in the gastrointestinal area. Histological changes were observed in the liver of hens fed the diets containing cadmium at higher dosages. The liver showed foci of lymphocytes, eosinophils and macrophages infiltrating portal tissue. The disorganized plates of hepatocytes and degeneration of parenchymal cells were common findings. In the kidneys, scattered accumulation of proximal convoluted tubules with swollen granular cytoplasm were observed in hens fed 20 ppm Cd after two months of exposure. The epithelial cells of renal tubules exhibited cloudy swelling and degenerating cells. Cells of tubules of the Henle loop were also swollen, while cells of adjacent tubules appeared shrunken. Some collecting tubules were dilated and showed signs of tubular necrosis. In cortex, there were the areas with interstitial fibrosis.

Mortality of the offspring

The mortality rate of the chicks up to 7 days of age, hatched from treated hens, ranged within 0.25 and 1.11% (Tab. II). Although the level of cadmium in the experimental groups was very low, this finding showed signs of an increase in the mortality of chicks after the

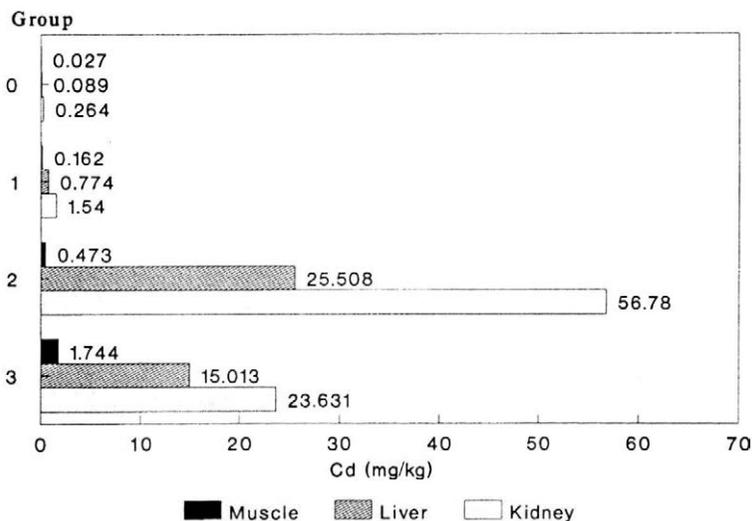
III. Levels of cadmium in muscle, liver and kidneys in 7 days old chicks (mg/kg)

1st sampling	Group			
	0	1	2	3
Muscle	0.005	0.004	0.004	0.004
Liver	0.003	0.007	0.019	0.013
Kidneys	0.051	0.016	0.021	0.014
2nd sampling				
Muscle	0.002	0.004	0.001	0.004
Liver	0.010	0.012	0.009	0.008
Kidneys	0.019	0.013	0.008	0.009

exposure of breeding hens to cadmium, mainly in group 2 receiving a higher dose of Cd. In group 3, when compared with group 2, a slight decrease in the mortality of chicks due to the addition of selenium was found.

Level of cadmium in the offspring

The level of cadmium in the organs, analysed in the chicks up to 7 days of age, after the 1st and 2nd month of experiment was very low when compared with the adult hens treated with cadmium. In the muscle, the level of cadmium in all groups (Tab. III) remained be-



1. Levels of Cd in tissues of laying hens

low the concentration found in the control group (0.005 mg/kg) at both samplings. In the liver and kidneys, numerical data showed after the 1st month that Cd level partially increased and depended on the dosage of cadmium applied. The highest level was found in kidneys from group 2 after the 1st month of experiment. The addition of Se resulted in a decrease of Cd level, reaching in the kidneys and liver 0.14 and 0.13 mg/kg, respectively. At the 2nd sampling, higher level of Cd was also found in the kidneys and liver, but no significant differences were found between experimental and control groups.

DISCUSSION

A toxic effect of cadmium on body weight was reflected only in a partial reduction in females in group 2 (20 ppm Cd), which reached only 97.9% of the weight before treatment. Group 1, with the low dosage of Cd, and group 3, with the highest dosage of Cd supplemented with Se, showed the same weight as before treatment. In cocks, body weight revealed a slight increase in all groups, but there were no marked differences between the experimental groups. It seems that the doses used in our experiment were too small to influence the body weight markedly. Nevertheless, it seems that certain variability in toxic effects exists between the female and male sex and that the effect of Cd is more pronounced in hens than in cocks. In various experiments as well as by analyses made in wild animals, low levels of cadmium were found in muscles. In free living pheasant, Tota et al. (1987) found in muscle tissue 0.10 mg/kg and Neze1 and Vogt (1977) in a control group of domestic fowl 0.05 mg/kg Cd. The level of cadmium in muscle tissue of the control group in our experiment was 0.027 mg/kg. In experimental groups, a considerable increase of Cd level was observed, depending on the dosage of Cd administered. In group 2 (dosage 20 ppm), an increase to 0.473 mg/kg was observed. This level is higher than that in the experiment of Neze1 and Vogt (1977), who found only 0.08 mg/kg after the administration of Cd at 30 mg/kg feed.

In contrast to the muscle tissue, the liver and kidneys show a high tendency to accumulate cadmium, and especially kidneys are mostly exposed to this accumulation. Neze1 and Vogt (1977) found in the liver and kidneys of the control group of domestic fowl 0.26 and 0.56 mg/kg.

Tota et al. (1987) found 0.13 and 0.7 mg/kg Cd in the liver and in the kidneys of pheasants in an industrial zone. We also observed a higher level of Cd accumulation in the liver and kidneys in all groups including the control group. In experimental group 1, the increase of Cd level in the liver, when compared with the muscle, was about 5 times higher and in the kidneys about 10 times higher. In the experimental group 2, much

higher accumulation of Cd in the liver and kidneys was observed. The kidney is known to be the main target organ of cadmium, and chronic or acute exposure induces kidney damage. Leach et al. (1979) fed to broiler chicks and laying hens diets supplemented with cadmium and found that already 3 µg/g of Cd resulted in an increased cadmium content of kidney, while only higher doses (12 and 48 µg/g) resulted in an increase in the cadmium content of liver and muscle. In our experiment, a small increase of Cd level was observed in the muscle and somewhat higher in the liver, even with the low dose of cadmium applied.

There are changes in kidney cadmium levels after combined administration of cadmium and essential metals (Groten et al., 1991; Hill, 1974). However, the influence of essential metals on the nephrotoxicity of cadmium is not still clear. Ohta et al. (1993) found that Se deficiency results in an increased Cd accumulation in the kidney, heart and liver in mice. The protective effect of selenium on Cd deposition was demonstrated also in our experiment in group 3, where a decrease of Cd level was observed in the liver and kidneys. The histopathological changes described here largely coincide with those described for cadmium intoxication in various animal species by Richardson et al. (1974), Pritzel et al. (1974), Aughey et al. (1984) and Wang et al. (1993). These changes are interpreted to be related to the membrane damages of various tissue cells (Vojtišek et al., 1989; Sövényi and Szacolczay, 1993).

In agreement with the above mentioned data in adult hens and cocks, cadmium accumulated in eggs also accumulates mostly in the liver and in kidneys of chicks hatched from eggs of treated hens. In these organs, signs of the protective effect of Se were seen after the 1st month of experiment, but not after the second month.

Although the problem of residual Cd transfer from hens through their eggs into the chicks did not attract sufficient attention in the literature, there are yet data showing (Leach et al., 1979; Sell, 1975) that the residual Cd penetration into the eggs does not occur. Results we have obtained in the liver and kidneys showed that this transport exists to a small extent. This fact was partially confirmed also in the other part of our experiment, when analysing the mortality of chicks, which showed a small increase in groups hatched from hens fed higher doses of Cd.

Data obtained so far showed that cadmium is highly toxic to a chick embryo. Birge and Roberts (1976) noted that the administration of 0.001 mg Cd resulted in a 65% mortality of embryos. These data would suppose a high mortality of the used embryos and of young chicks after their hatch. Despite the low mortality of chicks found in our experiment, it can be assumed that cadmium, especially after a long-term and high-dose administration, would have a negative effect on the further physiological state of the offspring hatched from eggs of exposed hens.

REFERENCES

- ANDERSEN, O. – NIELSEN, J. B. – SVENDSEN, P.: Oral cadmium chloride intoxication in mice: Effects of dose in tissue damage, intestinal absorption and relative organ distribution. *Toxicology*, *48*, 1988: 225–236.
- AUGHEY, E. – FELL, G. S. – SCOTT, R. – BLACK, M.: Histopathology of early effects of oral cadmium in the rat kidney. *Envir. Hlth Perspect.*, *54*, 1984: 153–161.
- BAKER, D. E. – AMACHER, M. C. – LEACH, R. M.: Sewage sludge as a source of cadmium in soil-plant-animals systems. *Envir. Hlth Perspect.*, *28*, 1979: 45–49.
- BIRGE, W. J. – ROBERTS, O. W.: Toxicity of metal mixture to chick embryos. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, *16*, 1976: 314–318.
- DOYLE, J. J.: Effect of low levels of dietary cadmium in animals. A review. *J. Envir. Qual.*, *6*, 1977: 111–116.
- GRÖSMANN, G. – EGELS, W.: Untersuchungen über den Cadmium Gehalt in Einzelfuttermitteln. *Landwirtsch. Forsch.*, *28*, 1975: 164–173.
- GROTEN, J. P. – SINKELDAM, E. J. – LUTEN, J. B. – VAN BLADERN, P. J.: Cadmium accumulation and metallothionein concentrations after 4-week dietary exposure to cadmium or cadmium-metalllothionein in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, *111*, 1991: 504–513.
- GUBB, P. J. O. – KENCH, J. E.: Distribution of cadmium in liver cells of cadmium poisoned chicks. *S. Afric. Med. J.*, *45*, 1971: 588.
- HILL, C. H.: Reversal of selenium toxicity in chicks by mercury, copper, and cadmium. *J. Nutr.*, *104*, 1974: 593–598.
- KOSSAKOWSKI, S. – DZIURA, A.: Dynamics of the distribution of cadmium in the skeleton of rabbits. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, *38*, 1993: 121–125.
- KRAMPIZ, G. – SVELZ, M. – HARDBECK, H.: Die Wirkung von Cadmiumgaben auf das Huhn I. Die Toxizität von Cadmium beim Huhn. *Arch. Geflügelk.*, *38*, 1974: 86–90.
- LEACH, R. M. Jr. – WANG, K. W. L. – BAKER, D. E.: Cadmium and the food chain: The effect of dietary cadmium on tissue composition in chicks and laying hens (residues in meat and eggs, toxicity). *J. Nutr.*, *109*, 1979: 437–443.
- MAYACK, J.: Tissue residues of dietary cadmium in wood ducks. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.*, *10*, 1981: 637–645.
- NECHAY, B. R. – SAUDERS, J. P.: Inhibition of renal adenosine triphosphatase by cadmium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *200*, 1977: 623–629.
- NEZEL, K. – VOGT, H.: Der Einfluss von Cadmiumzusatz zum Broiler- und Legehennenfutter auf Leistung der Tiere und auf Rückstandsgehalte in den Geweben und Eiern. 2. Mitteilung: Einfluss verschiedener Cadmiumzusätze zum Futter auf die Rückstände in den Geweben und Eiern. *Arch. Geflügelk.*, *41*, 1977: 81–86.
- OHTA, H. – SEKI, Y. – IMAMIYA, S. – YOSHIKAWA, H.: Influence of dietary selenium (Se) on chronic cadmium (Cd) toxicity in mice. In: ANKE, M. – MEISSNER, D. – MILLS, C. F. (eds.): Trace elements in man and animals. Verlag Media Touristik, 1993: 963–965.
- PRITZL, H. C. – LIE, Y. H. – KIENHOLT, E. W. – WHITEMAN, C. E.: The effect of dietary cadmium on development of young chickens. *Poultry Sci.*, *53*, 1974: 2026–2029.
- RAGAN, H. A. – MAST, T. J.: Cadmium inhalation and reproductive toxicity. *Rev. Envir. Contam. Toxicol.*, *114*, 1990: 1–22.
- RICHARDSON, M. E. – SPIVEY FOX, M. R. – FRY, B. E. Jr.: Pathological changes produced in Japanese quail by ingestion of cadmium. *J. Nutr.*, *104*, 1974: 323–338.
- SAYGI, S. – DENIZ, G. – KUTSAL, O. – VURAL, N.: Chronic effects of cadmium on kidney, liver, testis, and fertility of male rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, *31*, 1991: 209–214.
- SELL, J. L.: Cadmium and the laying hen: apparent absorption, tissue distribution and virtual absence of (dietary) transfer into eggs. *Poultry Sci.*, *54*, 1975: 1674–1678.
- SÖVENYI, J. – SZAKOLCZAI, J.: Studies on the toxic and immunosuppressive effects of cadmium on the common carp. *Acta Vet. Hung.*, *41*, 1993: 415–426.
- TOTA, J. – PAVELKA, J. – KAČMÁŘ, V.: Occurrence of chemical elements in wild animals and sheep in North Moravian region. *Veterinářství*, *37*, 1987: 82–85.
- VOJTÍŠEK, M. – HULINSKÁ, D. – BITTNEROVÁ, G. – CIKRT, M. – HULINSKÝ, V.: Cadmium influence on the rat liver. *Acta Morph. Hung.*, *37*, 1989: 201–217.
- WAHBA, Z. Z. – COOGAN, T. P. – RHODES, S. W. – WAALKES, M. P.: Protective effects of selenium and cadmium toxicity in rats: role of altered toxicokinetics and metallothionein. *J. Toxicol. Envir. Hlth*, *38*, 1993: 171–182.
- WANG, X. P. – CHAN, H. M. – GOYER, R. A. – CHERIAN, M. G.: Nephrotoxicity of repeated injections of cadmium-methallothionein in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, *119*, 1993: 11–16.

Arrived on 24th April 1995

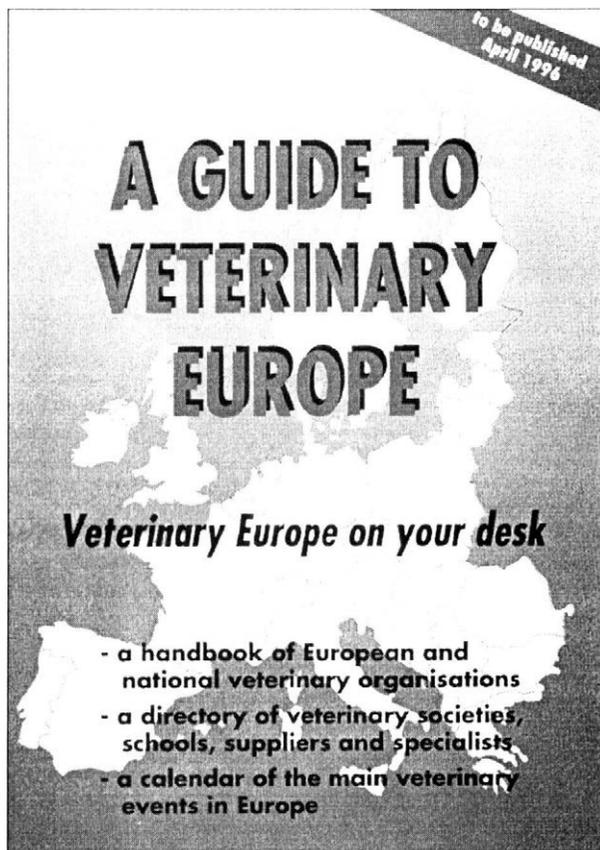
Contact Address:

MVDr. Elena Marettová, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/622 99 24, fax 095/76 76 75

PRESS RELEASE

A Guide to Veterinary Europe WANTED : YOUR ADDRESS

The **Guide to Veterinary Europe**, compiles a wealth of information for the European veterinarian. In The Guide, to be published April 1996, you will find names and numbers of all main veterinary (national, european and specialist) associations, schools, services, specialist colleges and clinics, veterinary suppliers, publications as well as a calendar of forthcoming events throughout Europe. The guide will also supply detailed information about the veterinary structure of the EU, veterinary lobbying, Erasmus exchanges, requirements for working abroad and much more. Obviously, we would like the *Guide to Veterinary Europe* to be as complete as possible.



If you know of a veterinary association, organisation, specialist clinic or supplier of European scope which should be included, please contact us at the below address.

Contact:

Karin de Lange DVM, *Guide to Veterinary Europe*,
Les Éditions du Point Vétérinaire,
BP 233, F-94702 Maisons-Alfort, France.
tel + 33 1 45 17 02 25 or fax + 33 1 45 17 02 74

Alfort, 4 September 1995

THE EFFECT OF SOME PRESEVATIVES ON NATURAL MICROFLORA IN MILK SAMPLES

VLIV NĚKTERÝCH KONZERVAČNÍCH ČINIDEL NA PŘIROZENOU MIKROFLÓRU VZORKŮ MLÉKA

P. Benda

Research Institute for Cattle Breeding, Rapotín, Czech Republic

ABSTRACT: The paper presents a comparison of the efficiency of some preservatives used for instrumental analysis of microflora composition of milk. The preservatives used in the trial involved potassium bichromate (Merck), Milkofix preparation on the basis of colloidal silver (Tržický), sodium azide (Janssen Chimica) and Bronopol (PSL Microtabs) – Tab. I, Tab. III. Groups of microorganisms (mesophile microorganisms, coliform microorganisms, lactic fermentation bacteria, enterococci and staphylococci – Tab. II) were selected with respect to their expected occurrence at natural contamination of milk. There were highly significant differences ($P = 0.01\%$) between the preservatives in preservation effect shown as the number of colonies of the particular groups of bacteria. The best preservation effect was determined in Bronopol for all groups of microorganisms (Fig. 2), somewhat worse preservation capacity was found out in potassium bichromate (Fig. 3). Sodium azide (Fig. 4) and Milkofix (Fig. 5) had similar preservation characteristics; they had equivalent effects on lactic fermentation bacteria, Milkofix was more efficient at inhibition of enterococci while sodium azide was more efficient against mesophile microorganisms. The studied groups of bacteria can be divided on the basis of sensitivity to the used preservatives into organisms sensitive to preservatives including staphylococci and coliform microorganisms, and tolerant organisms that can grow even in the presence of preservatives, including enterococci, lactic fermentation bacteria and mesophile microorganisms.

milk; physico-chemical analysis; preservatives; natural microflora

ABSTRAKT: Práce se zabývá srovnáním účinnosti některých konzervačních činidel, používaných pro instrumentální analýzu látkového složení mléka. Z konzervačních činidel byly sledovány dvojjodan draselný (Merck), přípravek Milkofix na bázi koloidního stříbra (Tržický), azid sodný (Janssen Chimica) a Bronopol (PSL Microtabs). Skupiny mikroorganismů (mezofilní mikroorganismy, koliformní mikroorganismy, bakterie mléčného kvašení, enterokoky a stafylokoky) byly vybrány s ohledem na jejich předpokládaný výskyt při přirozené kontaminaci mléka. Mezi přípravky byly sledovány vysoce průkazné rozdíly v konzervačním účinku. Nejlepší konzervační schopnosti vykazoval pro všechny skupiny mikroorganismů přípravek Bronopol, poněkud horší konzervační účinek měl dvojjodan draselný. Azid sodný a přípravek Milkofix měly podobné konzervační vlastnosti; shodovaly se v působení na mléčné bakterie, enterokoky lépe inhiboval Milkofix a mezofilní mikroorganismy naopak azid sodný. Podle citlivosti na použitá konzervační činidla lze rozdělit studované skupiny bakterií na organismy citlivé ke konzervantům, kam patří stafylokoky a koliformní mikroorganismy, a organismy tolerantní, schopné růstu i v přítomnosti konzervačních látek, kam lze zařadit enterokoky, bakterie mléčného kvašení a mezofilní mikroorganismy.

mléko; fyzikálně-chemická analýza; konzervační činidla; přirozená mikroflóra

ÚVOD

Reprodukovatelná a přesná analýza základních fyzikálně-chemických vlastností syrového kravského mléka se v současné době, kdy doba transportu vzorků do centrálních laboratorí často překročí 24 hodin, neobejde bez chemických způsobů konzervace vzorků. Konzervační prostředek musí po co nejdelší dobu zabránit změnám složení vzorku, aniž by měl významný interferenční vliv na prováděné analýzy. Proto nelze používat jediný konzervant pro mikrobiologické a chemické analýzy mléka, neboť konzervační činidla používaná v mikrobiologických analýzách (Pettipher aj.,

1982; Heeschen aj., 1969) vykazují silné interference při infračervených analýzách mléka (Pettipher aj., 1982). Optimální konzervační prostředek by dále měl co nejméně zatěžovat životní prostředí. Konzervační účinnosti a rizika při použití různých konzervačních prostředků popsali někteří autoři (Weaver aj., 1977; Ardo, 1979; Kroeger, 1985; PSL Microtabs, 1987).

Snížit zátěž životního prostředí se pokusil Tržický (1990). Konzervační prostředek Milkofix Forte, založený na inhibičním účinku sloučenin stříbra, podle autora ve srovnání s ostatními konzervanty minimalizuje ekologická rizika.

Pravděpodobnost znehodnocení vzorku se zvyšuje s růstem doprovodné mikroflóry (H a n u š aj., 1992a). Cílem předložené práce bylo stanovit dopad konzervace vzorků na přirozenou mikroflóru mléka a pokusit se stanovit, které skupiny mikroorganismů mohou mít největší vliv na degradaci konzervovaných vzorků mléka.

MATERIÁL A METODA

Bazénové vzorky mléka ze dvou odběrných míst byly sterilně odebrány do vzorkovnic o objemu 500 ml. Ihned po doručení do laboratoře byly naplněny do inkubačních nádobek o objemu 30 ml s konzervačními činidly. Seznam sledovaných variant v pokusu uvádí tab. I. Každý bazénový vzorek byl inkubován ve třech opakováních uvedených pěti variant. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě ve tmě v neprodyšně uzavřených inkubačních nádobkách. Jednotlivá konzervační činidla byla použita v koncentracích uvedených v tab. I. Ve vzorcích byly stanovovány skupiny mikroorganismů podle tab. II. V této tabulce jsou uvedena i použítá kultivační média.

V pravidelných intervalech 24 hodin, s prvním odběrem ihned po zahájení inkubace, byla ve vzorcích stanovována četnost uvedených skupin bakterií. K analýze byly použity pouze vzorky nesražené, vzorky s masivní sraženinou byly postupně vylučovány z pokusu. Po naředění sterilním fyziologickým roztokem byla příslušná ředění vzorku v množství 1 ml (resp. 0,1 ml) pipetována do prázdných Petriho misek a zalévána ochlazenou živnou půdou (mezofilní mikroorganismy a počet koliformních bakterií) nebo rozetřena na povrch půd v Petriho miskách (stanovení stafylokoků, enterokoků a bakterií mléčného kvašení). K analýze se používala nejméně tři ředění každého vzorku, každé ředění bylo kultivováno ve třech opakováních.

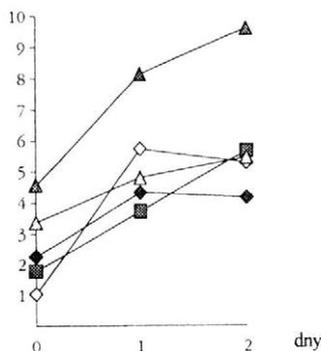
Pro statistické hodnocení výsledků bylo použito pouze kritérium maximální hodnoty CFU/ml během inkubace. Délka lag fáze byla hodnocena pouze orientačně a ani původně předpokládanou generační dobu nebylo možno exaktně hodnotit, neboť časové intervaly mezi jednotlivými odběry byly příliš hrubé. Jako statistická metoda byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění.

VÝSLEDKY

Varianta N – vzorky nekonzervovány

Všechny sledované skupiny mikroorganismů v této variantě vykazovaly značnou růstovou aktivitu. Již po 24 hodinách inkubace vzorku došlo k pomnožení na hodnoty asi 10^5 CFU/ml (u stafylokoků) až 10^8 CFU/ml (mezofilní mikroorganismy). Po 48 hodinách inkubace byly již vzorky částečně sražené, obtížně se zpracovávaly a hodnoty CFU/ml dosahovaly asi 3×10^5 (stafylokoky), resp. nejvíce 5×10^8 (mezofilní mikroorganismy).

log CFU/ml



1. Růst mikroorganismů ve vzorcích mléka bez konzervačních prostředků – Microorganism growth in milk samples without preservatives

Legenda k obr. 1–5 – Legend to Figs. 1–5

- ▲ mezofilní organismy – mesophile organisms
- ◇ koliformní organismy – coliform organisms
- laktobacilly – lactobacilli
- △ stafylokoky – staphylococci
- ◆ enterokoky – enterococci
- dny – days

my). Další odběrový termín, tj. 72 hodin od počátku inkubace, byly vzorky zcela sražené (obr. 1). Vzhledem k dlouhým odběrovým intervalům u nekonzervované varianty zcela chyběla lag fáze.

Varianta B – vzorky konzervovány přípravkem Bronopol

Nejlepší konzervační účinek na všechny sledované skupiny mikroorganismů vykazoval jednoznačně přípravek Bronopol. Odlišnost od všech ostatních použitých konzervantů byla výsoce průkazná ($P = 0,01 \%$) pro všechny skupiny mikroorganismů. Ve všech případech trvala lag fáze růstových křivek celou dobu sledování. Pouze u celkového počtu bakterií lze pak v závěru pokusu konstatovat náznak přechodu do fáze zrychleného růstu, přesto hodnoty počtu bakterií nedosahují startovních hodnot okolo 10^4 CFU/ml (obr. 2).

Varianta C – vzorky konzervovány dvojjodnanem draselným

Podle účinku dvojjodnanu draselného na rychlost růstu lze sledované mikroorganismy rozdělit na dvě skupiny:

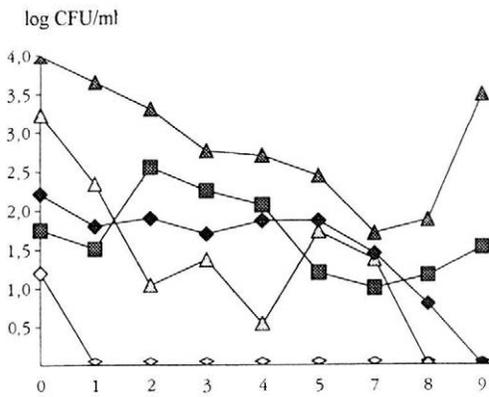
1. Skupina výrazně inhibovaných mikroorganismů, kam lze zařadit stafylokoky a koliformní bakterie. Růst byl drasticky potlačen a během celého trvání pokusu nedošlo ke zvýšení počtu CFU/ml nad původní hodnoty.

I. Seznam variant pokusu a konzervačních činidel – Trial variants and a list of preservatives

Skupina mikroorganismů Kultivační doba/teplota	Kultivační médium, výrobce	Group of microorganisms Cultivation time/temperature	Culture medium, manufacturer
Mezofilní mikroorganismy 72 h/30 °C	živný agar č. 2 Imuna, Šarišské Michalany, obohacen glukózou do koncentrace 10 g/l před vylitím na misky, inokulum zaléváno	Mesophile microorganisms 72 h/°C	Nutrient agar no. 2 (Imuna, Šarišské Michalany), glucose-enriched to reach concentration 10 g/l before pouring onto dishes, inoculum watered
Koliformní bakterie 48 hod/37 °C	Mc Conkey agar pro stanovení enterobaktérií, Imuna, inokulum zaléváno	Coliform bacteria 45 h/37 °C	McConkey agar for detection of enterobacteria, Imuna, inoculum watered
Stafylokoky 72 hod/37 °C	selektivní agar pro stanovení stafylokoků Mannitol Salt Phenol Red agar, složení podle Mercks č. 5404, inokulace na povrch půdy	Staphylococci 72 h/37 °C	selective agar for detection of staphylococci Mannitol Salt Phenol Red Agar, composition according to Merck no. 5404, inoculation onto medium surface
Enterokoky 48 hod/37 °C	selektivní agar pro stanovení enterokoků Slanetz-Bartley, předpis Merck č. 5262, inokulace na povrch půdy	Enterococci 48 h/37 °C	selective agar for detection of enterococci Slanetz-Bartley, prescription Merck no. 5262, inoculation onto medium surface
Baktérie mléčného kvašení 120 hod/30 °C	Rogosa SL agar pro stanovení bakterií mléčného kvašení, předpis Merck č. 5413, inokulace na povrch půdy	Lactic fermentation bacteria 120 h/30 °C	Rogosa SL agar for detection of lactic fermentation bacteria, prescription Merck no. 5413, inoculation onto medium surface

II. Sledované skupiny mikroorganismů a použitá kultivační média – The groups of microorganisms under observation and the used culture media

Označení varianty	Konzervační činidlo	Složení a koncentrace v 25 ml mléka	Variant	Preservative	Composition and concentration in 25 ml milk
N	bez konzervačních činidel	nekonzervováno	N	no preservatives	without preservation
A	azid sodný	konzervační směs 0,0085 g NaN ₃ (Janssen Chimica) a 0,063 g NaCl, připravováno v laboratoři	A	sodium azide	preservation mixture of 0.0085 g NaN ₃ (Janssen Chimica) and 0.063 g NaCl, prepared at a lab
B	Bronopol	konzervační směs 0,005 g 2-bromo-2-nitro-1,3 propandiolu a 0,050 g NaCl, tablety PSL Microtabs	B	Bronopol	preservation mixture of 0.005 g 2-bromo-2-nitro-1,3 propandiol and 0.050 g NaCl, FSL Microtabs
C	dvochroman draselný	0,033 g K ₂ Cr ₂ O ₇ a 0,067 g KCl, tablety Merck	C	potassium bichromate	0.033 g K ₂ Cr ₂ O ₇ and 0.067 g KCl, Merck tablets
M	Milkofix	složení neudáno, 0,125 g práškové směsi (Tržický)	M	Milkofix	composition not indicated, 0.125 g of powder mixture (Tržický)



2. Růst mikroorganismů ve vzorcích mléka s obsahem konzervačního prostředku Bronopol – Microorganism growth in milk samples containing the preservative Bronopol

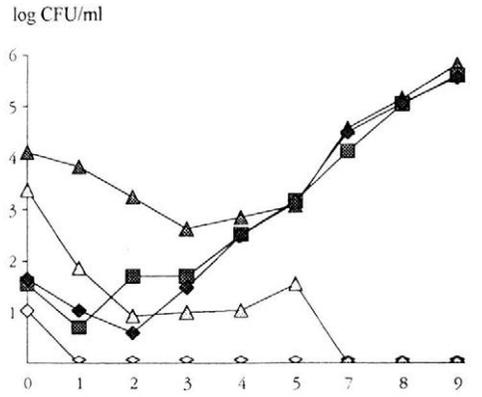
2. Skupina mikroorganismů omezeně rostoucích v prostředí s dvojjodnanem draselným. Růst této skupiny nebyl zcela inhibován, přesto však lag fáze růstových křivek trvala až do pátého dne od zahájení pokusu. Také v následující fázi konečné počty dosahovaly pouze asi $5,5 \times 10^5$ CFU/ml. Do uvedené skupiny lze zařadit enterokoky, bakterie mléčného kvašení a mezofilní mikroorganismy (obr. 3). Dvojjodnan draselný vykazuje nižší ($P = 0,01$ %) konzervační účinek než Bronopol, ale vysoce průkazně ($P = 0,01$ %) vyšší než ostatní konzervanty.

Varianta A – vzorky konzervovány azidem sodným

Azid sodný se v účinku na sledované skupiny mikroorganismů příliš neliší od přípravku Milkofix, kde pro azid sodný lze lepší konzervační schopnost pozorovat pro mezofilní mikroorganismy ($P = 0,01$ %), horší naopak pro enterokoky ($P = 0,05$ %). Pro bakterie mléčného kvašení jsou u obou konzervantů rozdíly neprůkazné. Také zde jsou stafylokoky a koliformní bakterie potlačeny a nárůst počtu kolonií lze pozorovat pouze u bakterií mléčného kvašení, enterokoků a celkového počtu mikroorganismů. Konečná koncentrace bakterií přesahuje u všech tolerantních skupin hodnotu 10^7 CFU/ml, což je téměř o dva řády více než v případě dvojjodnanu a zhruba na úrovni přípravku Milkofix. Lag fáze tolerantních mikroorganismů je však v tomto případě výrazná a trvá 48 hodin (obr. 4).

Varianta M – vzorky konzervovány přípravkem Milkofix

Přípravek Milkofix má typický dobrý konzervační účinek na koliformní bakterie a stafylokoky a omezené působení v případě enterokoků, celkového počtu bakterií a bakterií mléčného kvašení. Růstové křivky uve-



3. Růst mikroorganismů ve vzorcích mléka s obsahem dvojjodnanu draselného jako konzervačního prostředku – Microorganism growth in milk samples containing potassium bichromate as a preservative

dených tolerantních skupin mikroorganismů jsou typické nevýraznou lag fází a značně vysokými konečnými počty mikroorganismů (řádově 10^7 – 10^8 CFU/ml), které po dosažení maxima neklesají (obr. 5).

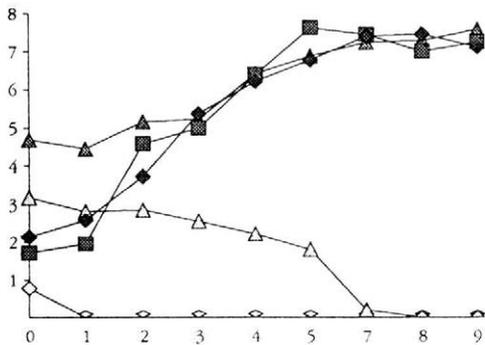
DISKUSE

Předložená práce je součástí širší studie, zaměřené na sledování účinnosti konzervačních přípravků ve vztahu nikoli k mikrobiálním, ale k fyzikálně-chemickým vlastnostem mléka. Proto je výsledek nutno posuzovat z hlediska pravděpodobnosti změn látkového složení mléka. Z uvedeného důvodu také podle našeho názoru nebylo zcela nezbytné používat striktní metodiky mikrobiologických rozborů mléka dle ČSN 56 0083 a ČSN 56 0085; pro zjednodušení analýz jsme tedy použili z hlediska mlékařské mikrobiologie nekorektní metodiky. Pro posouzení dynamiky sledovaných skupin mikroorganismů ve vzorcích mléka je však považujeme za přijatelné.

Nejvyšší konzervační účinek, ať již použijeme k hodnocení kterékoliv kritérium, jednoznačně vykazoval Bronopol, což odpovídá i výsledkům chemických analýz (Hanuš aj., 1992b). Pettipher aj. (1982) při mikrobiologické analýze vzorků mléka konzervovaných přípravkem Bronopol došli k podobným výsledkům, uvádějí však značné zvýšení počtu kvasinek a plísní pozorované i na neselektivních kultivačních půdách. Uvedený jev však v našem případě nebyl potvrzen. Také v případě značně odlišných materiálů, jakými jsou siláže a senáže, se Bronopol ukázal jako velmi účinný konzervant (Woolford, 1975).

Dvojjodnan draselný byl ještě donedávna stále běžně používán při konzervaci vzorků mléka, i když jsou známy rizika při dlouhodobém vystavení pracovníků laboratoří tomuto konzervantu (Weaver aj., 1977; Hanuš aj., 1992a). Konzervační účinek dvojjodnanu draselného je však velmi dobrý, zvláště vý-

log CFU/ml



4. Růst mikroorganismů ve vzorcích mléka s obsahem azidu sodného jako konzervačního prostředku – Microorganism growth in milk samples containing sodium azide as a preservative

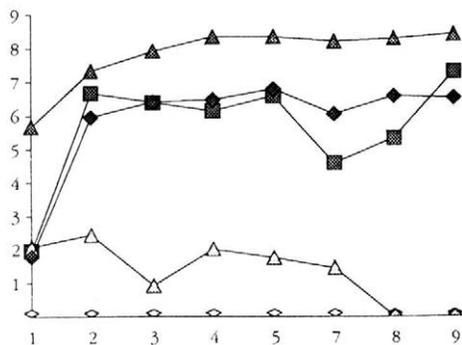
hodnou se jeví poměrně dlouhá lag fáze růstových křivek nejdůležitějších kontaminujících mikroorganismů (Hanuš aj., 1992a). I přes částečné pomnožení po pátém dni inkubace počty mikroorganismů nedosahují hodnot, které by mohly znamenat výrazné změny v látkovém složení uchovávaných vzorků.

V případě azidu sodného nejsou výsledky již zdaleka tak příznivé, neboť bakterie mléčného kvašení a zvláště pak enterokoky jsou k azidu sodnému rezistentní. Uvedené vlastnosti se dokonce využívá v selektivních kultivačních půdách (Slanetz a Bartley, 1957). Další nepříjemnou vlastností enterokoků je poměrně dobrý růst při nízkých teplotách a navíc i značná biochemická aktivita. Proto má azid sodný relativně špatné konzervační vlastnosti při teplotách běžných v chladničkách (Hanuš aj., 1992b).

Přípravek Milkofix, podobně jako v naší předchozí práci (Hanuš aj., 1992b), vykázal průkazně nižší konzervační účinek oproti dvojchromanu draselnému a přípravku Bronopol. Ve srovnání s azidem sodným hůře inhiboval růst mikroorganismů na neselektivní půdě pro mezofilní mikroorganismy, naopak enterokoky v souladu s předpoklady lépe tolerovaly prostředí s azidem. Opakovaně byl pozorován také značně omezený růst kolonií mikroorganismů v prostředí Milkofixu. Kolonie ovšem nebyly omezeny v počtu, ale pouze ve velikosti. Uvedený jev působí také značné potíže při odečtech počtu kolonií na miskách (Hanuš aj., 1992a).

Z výše uvedených údajů vyplývá, že také studované skupiny mikroorganismů lze rozdělit podle citlivosti ke studovaným konzervačním prostředkům. Ve všech konzervovaných variantách, na rozdíl od nekonzervovaných, hrály minimální roli koliformní bakterie a stafylokoky. Naproti tomu enterokoky, bakterie mléčného kvašení a skupina mikroorganismů rostoucí na neselektivní živné půdě, označovaná jako mezofilní mikroorganismy, tvoří skupinu organismů schopných růstu i v mléce s přísadkou konzervačních prostředků.

log CFU/ml



5. Růst mikroorganismů ve vzorcích mléka s obsahem konzervačního prostředku Milkofix – Microorganism growth in milk samples containing the preservative Milkofix

Všechny posledně uvedené skupiny mikroorganismů jsou biochemicky značně aktivní, proto riziko znehodnocení vzorku při pomnožení vlivem nedostatečné konzervace či špatného transportu je vysoké.

LITERATURA

- ARDO, Y.: Bronopol as a preservative in milk samples. *Milchwissenschaft*, 34, 1979: 14–16.
- HANUŠ, O. – BENDA, P. – GENČUROVÁ, V.: Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. I. Ověření bakteriostatických a baktericidních vlastností a interferenčního vlivu. *Veter. Med. (Praha)*, 37, 1992a: 21–31.
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – GABRIEL, B.: Vliv stárnutí vzorku na přesnost infraanalýzy základního složení mléka. *Veter. Med. (Praha)*, 37, 1992b: 149–160.
- HEESCHEN, W. – REICHMUTH, J. – TOLLE, A. – ZIEDLER, H.: Preservation of milk samples for bacteriologic and cytologic examinations and examinations for inhibitors. *Milchwissenschaft*, 24, 1969: 729–734.
- KROGER, M.: Milk sample preservation. *J. Dairy Sci.*, 68, 1985: 783–787.
- PETTIPHER, G. L. – RODRIGUES, C. – UBALDINA, M.: A bacteriostatic mixture for milk samples and its effect on bacteriological, cytological and chemical compositional analysis. *J. Appl. Bact.*, 52, 1982: 259–265.
- SLANETZ, L. W. – BARTLEY, C. H.: Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J. Bact.*, 74, 1957: 591–595.
- TRŽICKÝ, V.: Osobní sdělení. 1990.
- WEAVER, J. C. – KROGER, M. – MCCARTHY, R. D.: Distribution of dichromate in preserved milk toward utilization of spent milk samples from centralized testing laboratories. *J. Dairy Sci.*, 60, 1977: 706–709.

WOOLFORD, K. M.: Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. *J. Sci. Fd. Agric.*, 26, 1975: 229-237.
ČSN 56 0083. Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů plotnovou metodou. 1989.

ČSN 56 0085. Stanovení počtu koliformních bakterií plotnovou metodou. 1989.

PSL MICROTABS – Milk Preservative Tablets. Technical Bulletin, January 1987. Nottingham – England, San Francisco – USA. Firemní literatura.

Došlo 25. 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



THE ROYAL VETERINARY COLLEGE

University of London

Presents

A series of Continuing Education Activities

For 1996

Monday 15th - Friday 19th January:

A Five Day Course on Cattle Fertility and Reproduction.
Venue: Potters Bar

Monday 29th January - Friday 9th February:

A Two Week Course on Pig Health and Production.
Venue: Potters Bar

Monday 29th April - Friday 10th May:

A Two Week Course on Sheep Reproduction and Health.
Venue: Potters Bar

Monday 13th May - Friday 17th May:

A Five Day Course on the Microbiology of Foods of Animal Origin.
Venue: Camden Town

For further information please contact:

Maggie McEvoy, UVCE, The Royal Veterinary College, Royal College Street,
London NW1 0TU
Tel 0171 468 5170 Fax 0171 383 0615 E-mail uvce@rvc.ac.uk

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. Časopis zveřejňuje i názory, postřehy a připomínky čtenářů ve formě kurzívy, glosy, dopisu redakci, diskusního příspěvku, kritiky zásadního článku apod., ale i zkušenosti z cest do zahraničí, z porad a konferencí.

Autoři jsou plně odpovědní za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení 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. Redakce přijímá práce imprimitované vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením všech autorů, že se zveřejněním souhlasí.

Rozsah původních 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 práce rukopisu má odpovídat státní normě ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s prací pořízenou na PC v některém textovém editoru, nejlépe v T602. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

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.

Název práce (titul) nemá přesáhnout 85 úhozů a musí dát přesnou představu o obsahu práce. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

Krátký souhrn (Abstrakt) musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo v práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě.

Rozšířený souhrn prací v češtině nebo slovenštině je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné jej (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

Literární přehled má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému. Tato úvodní část přináší také informaci, proč byla práce provedena.

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 a způsob hodnocení výsledků.

Výsledky tvoří hlavní část práce a 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 výsledky se konfrontují s údaji 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.

Klíčová slova mají umožnit vyhledání práce podle sledovaných druhů zvířat, charakteristik jejich zdravotního stavu, podmínek jejich chovu, látek použitých k jejich ovlivnění apod. Jako klíčová slova není vhodné používat termíny uvedené v nadpisu práce.

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

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 or a longer summary. The journal also publishes readers' views, remarks and comments in form of a text in italics, gloss, letter to the editor, short contribution, review of a major article, etc., and also experience of stays in foreign countries, meetings and conferences.

The authors are fully responsible for the originality of their papers, for its subject and formal correctness. The authors shall make a written declaration that their papers have 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 editors accept papers approved to print by the head of the workplace or papers with all the authors' statement they approve it to print.

The extent of original papers 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). A PC diskette should be provided with the paper, written in an editor program, preferably T602. 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 and it should provide a clear-cut idea of the paper subject. Subtitles of the papers are not allowed either.

Abstract. It must present 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.

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. This introductory section also provides information why the study has been undertaken.

Review of literature should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

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 and the method of result evaluation.

In the section **Results**, which is the core of the paper, 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.

Key words should make it possible to retrieve the paper on the basis of the animal species investigated, characteristics of their health, husbandry conditions, applied substances, etc. The terms used in the paper title should not be used as keywords.

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, telephone and fax number, or E-mail.

CONTENTS

Lauková A., Baran M., Siroka P.: The effect of monensin on the rumen strain <i>Enterococcus faecium</i> CCM 4231.....	337
Šutiaková I., Bekeová E., Šutiak V.: The effect of carbimasole on the activities of lactate dehydrogenase isoenzymes and concentrations of thyroid hormones in sheep.....	341
Bekeová E., Krajničáková, M., Hendrichovský V., Maraček I.: Thyroid and ovarian hormones in ewes treated with gestagen and PMSG in spring.....	345
Pribilincová J., Mareta M., Janotíková I., Marettová E.: The effect of cadmium treatment on breeding hens and cocks and early viability of their chickens.....	353
Benda P.: The effect of some preservatives on natural microflora in milk samples.....	359

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 40, č. 11, Listopad 1995

OBSAH

Lauková A., Baran M., Siroka P.: Efekt monenzínu na bachorový kmeň <i>Enterococcus faecium</i> CCM 4231.....	337
Šutiaková I., Bekeová E., Šutiak V.: Efekt karbimazolu na izoenzymy laktátdehydrogenázy a koncentrácie tyreoidálnych hormónov u oviec.....	341
Bekeová E., Krajničáková, M., Hendrichovský V., Maraček I.: Hormóny štítnej žľazy a vaječníka u bahníc ošetrených gestagénmi a PMSG v jarnom období.....	345
Pribilincová J., Mareta M., Janotíková I., Marettová E.: Vplyv kadmia na sliepky a prežívateľnosť mladých kurčiat.....	353
Benda P.: Vliv některých konzervačních činidel na přirozenou mikroflóru vzorků mléka.....	359