

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

1

VOLUME 41 (LXIX)
PRAHA
JANUARY 1996
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 Herzíg, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

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

Doc. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc., 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. MVDr. h. c. Leopold Pospíšil, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s.,

Jílové u Prahy, Czech Republic

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

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

Cíl a odborná náplň: Časopis Veterinární medicína uveřejňuje původní vědecké práce a studie typu review ze všech oblastí veterinární medicíny v češtině, slovenštině a angličtině.

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

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 41 vychází v roce 1996.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Zdeňka Radošová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezká 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 na celý rok (leden–prosinec) a měly by být zaslány na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezká 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1996 je 492 Kč.

Aims and scope: The journal Veterinární medicína original publishes papers and reviews from all fields of veterinary medicine written in Czech, Slovak or English.

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

Periodicity: The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 41 appearing in 1996.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: Ing. Zdeňka Radošová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezká 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, Slezká 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1996 is 115 USD (Europe), 120 USD (overseas).

GONADOTROPHIN RELEASING HORMONE TREATMENT OF HOLSTEIN COWS WITH FOLLICULAR CYSTS MONITORED BY SKIM MILK PROGESTERONE DETERMINATION

APLIKACE GnRH DOJNICÍM HOLŠTÝNSKÉHO PLEMENE S FOLIKULÁRNÍMI CYSTAMI MONITOROVANÝMI STANOVENÍM PROGESTERONU V MLÉCE

H. M. Eissa, M. S. El-Belely

Theriogenology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Giza, Egypt

ABSTRACT: Progesterone was assayed in skim milk fraction of 38 cystic cows, 26 (68.4%) of which had basal (<0.5 ng/ml) progesterone concentrations and were diagnosed as having follicular cysts. These cows were allotted at random to one of 3 treatments: (1) a sham injection of sterile water in 7 cows as controls; (2) a single injection (1 mg) of GnRH analog in 8 cows; (3) double injections (1 mg) of GnRH analog at 7-day interval in 11 cows. According to rectal palpation confirmed by skim milk progesterone determination, the double injection group responded well ($P < 0.05$) compared with the single injection and control groups (81.8% vs 62.5% vs 42.9%). The interval calving to 1st insemination, interval treatment to conception and interval calving to conception were significantly ($P < 0.01$) shorter in the double injection group than in the other 2 groups. Also, the conception rate to first insemination was significantly ($P < 0.05$) higher (63.6% vs 37.5% vs 42.9%). The data provide evidence for reduction in infertility and reproductive disorders in cystic cows given double injections of GnRH.

cattle; cysts; fertility disorders; progesterone; assays; GnRH application

ABSTRAKT: Ve frakci odstředěného mléka od 38 dojnic s cystami jsme stanovili obsah progesteronu; 26 z nich (68,4 %) vykazovalo základní koncentrace progesteronu (<0,5 ng/ml) a diagnostikovali jsme u nich folikulární cysty. Tyto dojnice jsme náhodným výběrem rozdělili a ošetřili jedním z následujících postupů: 1) injekční dávka sterilní vody aplikovaná sedmi dojnicím, které sloužily jako kontrola; 2) jedna injekční dávka (1 mg) analogu GnRH aplikovaná osmi dojnicím; 3) dvojitá injekční dávka (1 mg) analogu GnRH aplikovaná 11 dojnicím v intervalu sedmi dní. Rektální palpací, kterou potvrdilo stanovení progesteronu v odstředěném mléce bylo stanoveno, že reakce skupiny dojnic s dvojitou injekční dávkou byla uspokojivá ($P < 0,05$) ve srovnání se skupinou, která dostala jednu injekční dávku a s kontrolní skupinou (81,8 % resp. 62,5 % resp. 42,9 %). U skupiny s dvojitou injekční dávkou byl ve srovnání s dvěma ostatními skupinami významně kratší ($P < 0,01$) interval mezi otelením a 1. inseminací, interval mezi ošetřením a zabřeznutím a interval mezi otelením a zabřeznutím. Rovněž bylo významně vyšší ($P < 0,05$) procento zabřeznutí po první inseminaci (63,6 % resp. 37,5 % resp. 42,9 %). Tyto hodnoty dokumentují vhodnost dvojitě aplikace GnRH snížením poruch plodnosti a reprodukce u dojnic s cystami.

skot; cysty; poruchy plodnosti; stanovení progesteronu; aplikace GnRH

INTRODUCTION

Cystic ovarian degeneration associated with infertility has been reported in cows for more than a century. Despite considerable efforts by clinicians and researchers to discover the etiology and successful methods for treatment, this syndrome is still responsible for considerable economic loss in dairy herds and the incidence of this condition may be increased to 47% (Nessan et al., 1977; Peralta and Ax, 1982; Marcek et al., 1985).

The routine therapy employed for the treatment of cystic ovarian degeneration consists of the injection of

a single dose of either HCG (Nessan et al., 1977; Kesler and Garverick, 1982), $\text{PGF}_2\alpha$ (Dobson et al., 1977; Eddy, 1977; Humblot and Thibier, 1980) or GnRH (Manns and Richardson, 1976; Nessan et al., 1977; Kesler et al., 1981; Kesler and Garverick, 1982; Dinsmore et al., 1987, 1989). The results of these treatments in terms of fertility were not satisfactory and this may be due either to the improper regimens used in these treatments or to the incorrect pre-treatment differentiation between follicular and luteal cysts by rectal palpation of the ovaries (Nakao et al., 1983; Dinsmore et al., 1989). Therefore, differential diagnosis of the ovarian cysts by

determination of progesterone concentrations in blood or milk followed by using appropriate method of GnRH treatment may have an important role in the improvement of fertility of the affected cows.

The purpose of the present investigation was to evaluate what improvement in terms of fertility would be brought about if skim milk progesterone values were monitored before and after GnRH treatment which was used in a manner different from that previously reported.

MATERIALS AND METHODS

Animals

A total of 38 Holstein cows, maintained at the dairy barn of Michigan State University, were diagnosed via rectal palpation as having cysts. Findings were carefully recorded as to location, size, number and characteristics of the cysts. Oestral behaviour of the cows prior to treatment was also recorded as anoestrus or nymphomaniac. Age of the 38 cows averaged 6.2 ± 1.8 years and the mean interval between the last calving and the start of the experiment was 95 ± 10.8 days. None of these animals had been given any treatment for the ovarian dysfunction. Pre-treatment skim milk progesterone concentrations were measured 3 times every 72 hours to differentiate between the different types of cysts. Twenty-six cows had a base-line (<0.5 ng/ml) progesterone concentrations and were judged to have follicular cysts. The other 12 cows had higher (>1 ng/ml) progesterone concentrations and were considered to have had luteal cysts. These 12 cows were not included in this study. The selected 26 cows were assigned to one of the following treatment regimens: a) a shame injection of sterile water in 7 cows as controls; b) a single injection (1 mg) of GnRH analog (Receptal, Hoechst) in 8 cows; c) double injections (1 mg) of GnRH analog at a 7-day interval in 11 cows. Approximately 10 days after the start of treatment all animals were re-examined rectally for morphologic changes in the ovaries confirmed by changes in skim milk progesterone levels. Animals establishing a normal post-treatment oestrous cycle were inseminated at the observed oestrus and pregnancy was verified by rectal examination 2 months later.

Sampling

For the correct judgement of luteinization following treatment, progesterone values were determined in milk samples collected daily for 20 days from both GnRH treatment groups (day of treatment = day 0) and in milk samples collected for the same interval during the first spontaneously recovered oestrous cycle of the control group (day 0 = day of the observed oestrus).

Stripping samples (samples taken by hand immediately after machine milking) were collected into ste-

rile plastic bags (Whirl-Pak, Nasco) and kept at -15 °C before transferring to the laboratory within 2 hours. The samples were cooled in the refrigerator for one hour and centrifuged at 4 229 g for 10 minutes. The skim milk was removed and stored at -20 °C until assayed. Three samples were separated into a flocculent precipitate and a clear fluid on thawing and were rejected from the hormonal assay.

Radioimmunoassay of progesterone

Progesterone (P4) was assayed without extraction from skim milk by using the FAO/IAEA solid-phase RIA kit (Coat-a-Count, Diagnostic Products Corporation). The intra-assay coefficients of variation averaged 3.8% at 1.2 ng/ml and 3.4% at 5.3 ng/ml ($n = 9$). The inter-assay coefficients of variation averaged 9.6% at 1.2 ng/ml and 5.7% at 5.3 ng/ml ($n = 9$). The sensitivity, specificity and accuracy of this method have previously been described (Eissa et al., 1994).

Statistical analyses

Hormonal variations were tested by least-squares analysis of variance using the general linear models procedures of the Statistical Analysis System (SAS, 1990). Differences between groups concerning fertility data and conception rates were, respectively, measured by one way analysis of variance and Chi-square analysis (Snedecor and Cochran, 1967). The data were expressed as mean \pm SE.

RESULTS

Clinical findings

Oestrous behaviour of the cows prior to treatment was similar in all cows, with 85% ($n = 22$) of the cows being in anoestrus. Thirty-two percent of the cysts were 2.5–3.0 cm in diameter, 57% were 3–4 cm and 11% were over 4 cm. Single cysts were predominant (74%) with the highest number occurring on the right ovary. Multiple cysts were detected with lower frequency and occasionally, cases were found to involve both ovaries.

Clinical response and post-treatment fertility parameters are indicated in Tab. I.

Out of the 19 treated cows, 14 (73.7%) responded well, as indicated by the increased skim milk progesterone concentrations, within 30 days of GnRH injection compared with 3 (42.9%) control cows which recovered spontaneously within 90 days of the treatment.

The mean interval between parturition and 1st insemination (1st oestrus) as well as between treatment and conception was 34 and 29 days, respectively, shorter ($P < 0.01$) in cows with double GnRH injections than in those with a single injection. Moreover, the interval between calving and conception was significantly ($P < 0.05$) shorter (22 days) in the first than in

Treatment	No. of cows responded	Interval calving to 1st A. I. (days)	Interval treatment to conception (days)	Interval calving to conception (days)	No. of cows conceived on 1st A. I.
Single injection (<i>n</i> = 8)	5 (62.5%) ^(a)	103.4 ± 9.5 ^(a)	57.6 ± 4.2 ^(a)	104.3 ± 9.2 ^(a)	3 (37.5%) ^(a)
Double injections (<i>n</i> = 11)	9 (81.8%) ^(b)	69.1 ± 3.2 ^(c)	28.3 ± 1.8 ^(c)	82.6 ± 5.3 ^(b)	7 (63.6%) ^(b)
Single + double injections combined (<i>n</i> = 19)	14 (73.7%) ^(a)	86.5 ± 5.2 ^(b)	43.2 ± 3.3 ^(c)	93.5 ± 6.4 ^(c)	10 (52.6%) ^(b)
Control (<i>n</i> = 7)	3 (42.9%) ^(c)	108.6 ± 8.6 ^(a)	72.5 ± 6.3 ^(a)	131.7 ± 11.3 ^(a)	3 (42.9%) ^(a)

a, b: Significant at 5% level

a, c: Significant at 1% level

the latter group. The conception rate was significantly ($P < 0.05$) higher in the double injection group. On the whole, the previously mentioned intervals were significantly shorter in the treated than in the control animals and the conception rate was higher ($P < 0.05$) in the former group.

Hormonal concentrations

Skim milk progesterone values for the treated and control cows with ovarian cysts before and after treatment are shown in Fig. 1.

The cows with a single injection showed a slow increase in progesterone concentrations 3 day after treatment and the values did not exceed 3 ng/ml until the end of sampling period. On the other hand, animals with double injections showed a significant ($P < 0.05$) increase in progesterone concentrations in excess of 3 ng/ml 3–4 days after the second injection. Progesterone values in the latter group increased progressively thereafter to reach over 5 ng/ml 4–6 days later on and decreased significantly ($P < 0.01$) at the end of sampling period. Progesterone concentrations of the double injection group approximated those of the control animals during the second half of the sampling period.

DISCUSSION

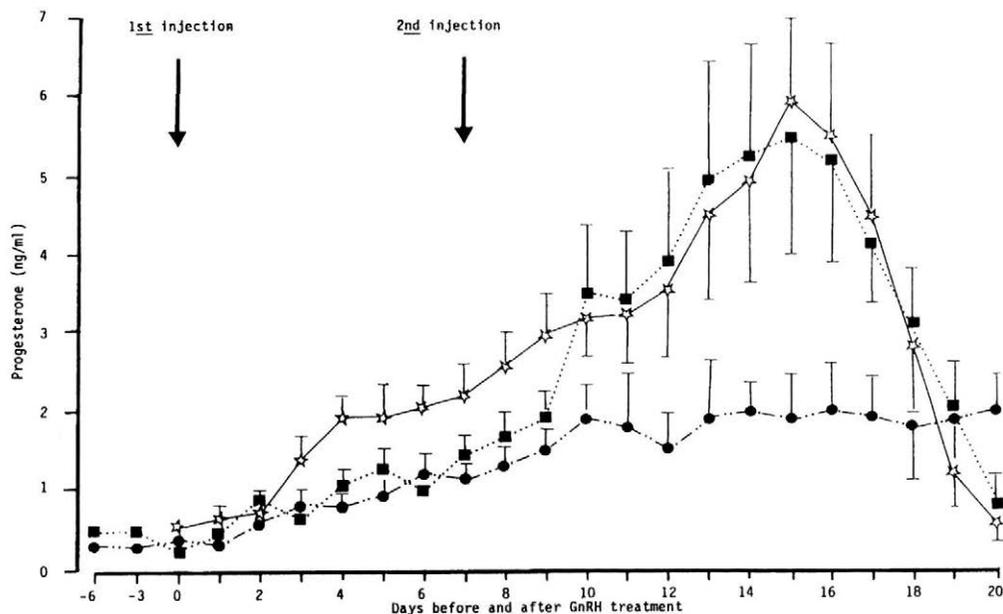
Clinical findings of cows diagnosed as having ovarian cysts in this experiment were similar to previous studies with regard to size of cysts, occurrence of multiple cysts and location (Bierschwal et al., 1975; Marcek et al., 1985; Dinsmore et al., 1989). The percent of anoestrous cows was slightly higher than those reported by Bierschwal et al. (1975), Nesson et al. (1977), Humblot and Thibier (1980).

Response to treatment with double injections of GnRH was better than a single injection reported in this study and those reported by Kesler et al. (1981), Nakao et al. (1983) and Dinsmore et al. (1987). Moreover, double GnRH injections resulted in a shorter

non-pregnant period and 64% of these animals could be inseminated and diagnosed pregnant to 1st A. I. before 50 days, compared with only 37% of the single injection and 43% of the control groups. This way of using double GnRH injections seemed more efficient than did that reported by Manns and Richardson (1976), Humblot and Thibier (1980) and Dinsmore et al. (1989), who recorded conception rates ranging from 50–55% following a single GnRH injection.

The higher success rate of double GnRH injection in this study may be explained after skim milk progesterone monitoring. Five cows (62.5%) of the single injection group displayed slight increases in progesterone concentrations and were considered as having follicular cysts in which luteinization was insufficient and the cysts remained after treatment. In contrast, complete luteinization had occurred after the 2nd GnRH injection in the other group of cows with regression of lutein tissues after the end of sampling period as did the control animals.

Although the mechanisms by which double treatments reestablish ovarian cycles with higher conception rates have not been fully established, extensive investigation has provided considerable insight regarding the mechanism of response to GnRH treatment. The higher skim milk progesterone concentrations secreted by the luteinized ovarian cysts following the 2nd injection play a major role in post-treatment concentrations of LH and oestradiol-17 β (Grunert, 1972; Grunert et al., 1974; Seguin et al., 1976; Kesler et al., 1981). Progesterone appears to have a negative feedback on the hypothalamus and pituitary on LH release (Kesler et al., 1980; Zaied et al., 1981; Kesler and Garverick, 1982) and content of progesterone in ovarian cyst fluid is negatively correlated with plasma oestradiol-17 β levels (Hernandez-Ledezma et al., 1982). Therefore, the higher skim milk progesterone concentrations following the second GnRH injection resulted in the decrease in pulsatile LH concentration and slow down progressive follicular development as well as oestradiol synthesis with subsequent normal follicular growth in conjunction with normal ovulation occurring at the post-treatment oestrous cycle.



1. Skim milk progesterone concentrations (mean \pm SE) in cystic cows treated with a single (●) and double (■) injections of GnRH or untreated controls (☆)

Acknowledgements

The authors acknowledge Prof. Dr. R. F. Nachreiner, Endocrine Diagnostic Section, Animal Health Diagnostic Laboratory, Michigan State University, East Lansing, MI 48823, USA for providing laboratory facilities, Mr. Bob Krefl for his help during the practical work. We also acknowledge the support from the Peace Fellowship Program, USAID.

REFERENCES

BIERSCHWAL, C. J. – GARVERICK, H. A. – MARTIN, C. E. – YOUNGQUIST, R. S. – CANTLEY, T. C. – BROWN, M. D.: Clinical response of dairy cows with ovarian cysts to GnRH. *J. Anim. Sci.*, **41**, 1975: 1660–1665.
 DINSMORE, R. P. – WHITE, M. E. – GUARD, C. L. – JASCO, D. J. – PERDRIZET, J. A. – POWERS, P. M. – SMITH, M. C.: A randomized double blind clinical trial of two GnRH analogs for the treatment of cystic ovaries in dairy cows. *Cornell Vet.*, **77**, 1987: 235–243.
 DINSMORE, R. P. – WHITE, M. E. – GUARD, C. L. – JASCO, D. J. – PERDRIZET, J. A. – POWERS, P. M. – SMITH, M. C.: Effect of gonadotropin-releasing hormone on clinical response and fertility in cows with cystic ovaries, as related to milk progesterone. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, **195**, 1989: 327–331.
 DOBSON, H. – RANKIN, J. E. F. – WARD, W. R.: Bovine cystic ovarian disease: Plasma hormone concentrations and treatment. *Vet. Rec.*, **101**, 1977: 459–461.

EDDY, R. G.: Cloprostenol as a treatment for non-visible oestrus and cystic ovarian disease in dairy cows. *Vet. Rec.*, **101**, 1977: 62–65.

EISSA, H. M. – NACHREINER, R. F. – REFSAL, K. R.: Skim milk progesterone in pregnant cows from insemination throughout lactation. *Vet. Res. Commun.*, **18**, 1994: 149–154.
 GRUNERT, E.: Etiology of cystic ovaries in domestic animals. VII. Int. Kongr. für Tierische Fortpflanzung, München, Band I., 1972: 287–294.

GRUNERT, E. – HOFFMANN, B. – AHLERS: Klinische und hormonalanalytische Untersuchungen bei Kühen mit Ovarialzysten vor und nach Gonadotropin-Releasing-Hormon (Gn-RH)-Verabreichung. *Dtsch Tierärztl. Wschr.*, **81**, 1974: 386–388.

HERNANDEZ-LEDEZMA, J. J. – GARVERICK, H. A. – ELMORE, R. G. – BROWN, E. M. – KESLER, D. T.: Gonadotropin releasing hormone treatment of dairy cows with ovarian cysts. III. Steroids in ovarian follicular fluid and ovarian cyst fluid. *Theriogenology*, **17**, 1982: 697–702.

HUMBLLOT, P. – THIBIER, M.: Progesterone monitoring anoestrous dairy cows and subsequent treatment with a prostaglandin F_{2α} analog or gonadotropin-releasing hormone. *Amer. J. Vet. Res.*, **41**, 1980: 1762–1766.

KESLER, D. J. – GARVERICK, H. A.: Ovarian cysts in dairy cattle: A review. *J. Anim. Sci.*, **55**, 1982: 1147–1159.

KESLER, D. J. – GARVERICK, H. A. – CAUDLE, A. B. – ELMORE, R. C. – JOUNGQUIST, R. S. – BIERSCHWAL, C. J.: Reproductive hormone and ovarian changes in cows with ovarian cysts. *J. Dairy Sci.*, **63**, 1980: 166–173.

KESLER, D. J. – ELMORE, R. G. – BROWN, E. M. – GARVERICK, H. A.: Gonadotropin releasing hormone treat-

- ment of dairy cows with ovarian cysts. I. Gross morphology and endocrinology. *Theriogenology*, 16, 1981: 207-217.
- MANN'S, J. G. – RICHARDSON, G.: Induction of cyclic activity in the early post-partum dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.*, 56, 1976: 467-475.
- MARCEK, J. M. – APPELL, L. H. – HOFFMAN, C. C. – MOREDICK, P. T. – SWANSON, L. V.: Effect of supplemental β -carotene on incidence and responsiveness of ovarian cysts to hormone treatment. *J. Dairy Sci.*, 68, 1985: 71-77.
- NAKAO, T. – SUGIHASHI, A. – SAGA, N. – TSUNODA, N. – KAWATA, K.: Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst, luteal cyst, and cystic corpus luteum in cows. *Amer. J. Vet. Res.*, 44, 1983: 888-890.
- NESSAN, G. K. – KING, G. J. – MCKAY, G. W. – THOMSON, J. D. – BERTRAND, W.: Treatment of cystic ovarian degeneration in dairy cows with gonadotrophic releasing hormone or human chorionic gonadotrophic hormone. *Can. Vet. J.*, 18, 1977: 33-37.
- PERALTA, R. U. – AX, R. L.: Incidences of cystic ovaries in Wisconsin dairy herds. *J. Dairy Sci.*, (Suppl. 1), 65, 1982: 182 (Abstract).
- SAS User's Guide. RAY, A. A. (ed.): Cary, NC. SAS Inc.
- SEGUIN, B. E. – CONVEY, E. M. – OXENDER, W. D.: Effect of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin in cows with ovarian follicular cysts. *Amer. J. Vet. Res.*, 37, 1976: 153-157.
- SNEDECOR, G. W. – COCHRAN, W. G.: *Statistical Methods*. 6th ed. Ames, Iowa, Iowa State University Press 1967.
- ZAIED, A. A. – GARVERICK, H. A. – KESLER, D. J. – BIRSCHWAL, C. J. – ELMORE, R. G. – YOUNGQUIST, R. S.: Luteizing hormone response to oestradiol benzoate in cows postpartum and cows with ovarian cysts. *Theriogenology*, 16, 1981: 349-358.

Arrived on 1st January 1995

Contact Address:

H. M. E i s s a, Theriogenology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Giza 12211, Egypt

INZERCE

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

Bližší informace získáte na adrese:

Redakce časopisu VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
k rukám ing. Z. Radošové
Ústav zemědělských a potravinářských informací
Slezská 7
120 56 P r a h a 2

ADVERTISEMENT

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

For more detailed information, please contact:

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

EVALUATION OF CANINE LYMPHOCYTE BLASTOGENESIS PRIOR AND AFTER *IN VITRO* SUPPRESSION BY DOG DEMODICOSIS SERUM USING ETHIDIUM BROMIDE FLUORESCENCE ASSAY

HODNOTENIE BLASTOGENÉZY LYMFOCYTOV Psov PRED SUPRESIOU *IN VITRO* A PO NEJ POMOCOU SÉRA OD DEMODIKÓZNYCH Psov PRI POUŽITÍ FLUORESCENČNÉHO TESTU S ETHIDIUM BROMIDOM

Š. Paulík¹, J. Mojžišová¹, V. Bajová¹, D. Baranová², I. Paulíková²

¹University of Veterinary Medicine, Department of Infectology, Košice, Slovak Republic

²University of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The mitogen induced blastogenic response of lymphocytes from normal dogs and dogs with generalized demodicosis (GD) was measured by the ethidium bromide (EB) fluorescence assay. Serum from GD dogs significantly suppressed the *in vitro* reactivity to Con A of peripheral blood lymphocytes (PBL) from normal dogs and GD dogs, however with a different percentage of suppression 40.6 and 81.2%, respectively. As a result, the degree of lymphocyte blastogenesis suppression in GD dogs did not parallel the immunosuppressive potency of their serum (Tab. IV). The data indicate that PBL obtained from GD dogs did not respond to Con A as well in the presence of serum from normal dogs as did PBL from normal dogs (Tab. IV). In one third of examined GD dogs a similar situation was described also by HIRSH et al. (1975). The basis for this cellular modified response is unknown. It does not appear that the age or the chronicity of the disease are related to this observation. Further studies are necessary to elucidate this relation. The GD dogs showed not only a significant depression of the lymphocyte response to Con A but also enhancement of the ability of unstimulated cells to proliferate was also observed (Tab. IV). Similar observation was reported by others (BARRIGA et al., 1992). The meaning of this is not clear at present. This finding is discussed in the light of proposed different effects of the parasite or the host's reactivity to the parasite on different subsets of lymphocytes. No significant difference of PBL responsiveness to Con A between healthy dogs with respect to the age (Tab. III) and the time of examination (compare results in Tabs. I and IV) was observed. Autologous serum showed a better responsiveness of normal canine lymphocytes to Con A than fetal calf serum (FCS). It is suggested that the use of FCS might lead to an erroneous judgement (Tab. I). Both lectins, Con A and PHA induced cell proliferation of healthy dogs in very similar amount (Tab. II). Our results indicated that EB fluorescence assay is a useful method for detection a response of canine lymphocyte blastogenesis.

dogs; demodicosis; lymphocyte blastogenesis; ethidium bromide fluorescence assay; mitogens; serum

ABSTRAKT: Sledovali sme úroveň mitogénom indukovanej blastogenézy periférnych krvných lymfocytov (PBL) u klinicky zdravých psov a psov s generalizovanou demodikózou (GD) fluorescenčnou metódou s ethidiom bromidom (EB). Sérum od psov s GD významne supresovalo *in vitro* blasttransformáciu PBL ku Con A rozdielne u zdravých psov (40,6 %, $P < 0,025$) a u psov s GD (81,2 %, $P < 0,005$), v porovnaní k odpovedi PBL u zdravých psov pri použití autologného séra. To naznačuje, že úroveň supresie blastogenézy PBL u GD psov nezodpovedala imunosupresívnej potencie ich séra. Navyše sme zaznamenali, že pri použití séra od normálnych psov bola reaktivita PBL ku Con A významne nižšia ($P < 0,05-0,01$) u psov s GD než u psov klinicky zdravých. Podstata tejto modifikovanej bunecnej odpovede u GD psov nie je zatiaľ známa. Nie je pravdepodobné, že vek alebo chronicita ochorenia u sledovaných zvierat súviseli s týmto pozorovaním. V porovnaní s klinicky zdravými psami bola u GD psov zaznamenaná zvýšená proliferácia nestimulovaných buniek. Nezistili sme rozdiel ($P > 0,05$) v reaktivite PBL ku Con A u zdravých psov vzhľadom na vek a rozdielnu dobu vyšetrovania. Odpovedavosť PBL ku Con A u zdravých psov bola vyrovnanejšia a výraznejšia ($P < 0,025$) pri použití autologného séra než bovinného fetálneho séra (BFS). To poukazuje na možnosť skresleného posudzovania výsledkov blastogenézy PBL u psov za použitia BFS. Úroveň blastogenézy PBL bola pri oboch nami použitých mitogénoch (Con A a PHA) rovnaká. Na základe dosiahnutých výsledkov konštatujeme, že EB fluorescenčná metóda je vhodná k posudzovaniu úrovne blasttransformačnej reaktivity lymfocytov u psov.

psy; demodikóza; blastogenéza lymfocytov; fluorescenčná metóda s ethidiom bromidom; mitogény; sérum

INTRODUCTION

Interest in examining the immunologic aspects of a host-parasite relationship has increased during the past 2 decades. Among the arthropods, the best known instance of host immunomodulation is the immunosuppression attributed to *Demodex canis* (Wikel, 1984). Depression of lymphocyte mitogen responsiveness in dogs with demodicosis (Stott et al., 1974, 1976; Barriga et al., 1992) is due to the presence of suppressive factor in serum as observed by using a nonspecific lymphocyte transformation technique (Hirsh et al., 1975; Krawiec and Gaafar, 1980).

Lymphocyte blastogenesis has been widely assayed by the incorporation of radiolabelled thymidine into lymphocytes. However, this method has certain disadvantages using radioisotope. Therefore, a new accurate and practical method have been developed for evaluation of lymphocyte blastogenic response, such as a fluorescence assay with ethidium bromide (Nagahata et al., 1984). Ethidium bromide (EB) fluorescence assay was applied to examine the blastogenesis of peripheral blood lymphocytes from healthy animals (Nagahata et al., 1986; Inoue et al., 1987; Tajima et al., 1987) including dogs (Nakanishi et al., 1986).

The pattern of lymphocyte activation response is very similar whether a specific or nonspecific agent is used (Singer, 1974). Concanavalin A and phytohemagglutinin are efficient canine T-cell stimulants (Schultz and Adams, 1978; Krakowka, 1987). The lymphocyte blastogenesis technique is helpful in the laboratory diagnosis of immunosuppressive status in dog (Barta and Oyekan, 1981; Medleau et al., 1983; Barriga and Al-Khalidi, 1986).

The present study was undertaken to evaluate the lymphocyte blastogenic response to Con A for the various combinations of cells and serum from normal dogs and dogs with generalized demodicosis with respect to determination of the amount of blastogenesis suppression using EB fluorescence assay. The effect of different conditions, such as culture serum, mitogen, age and time of examination on the canine lymphocyte blastogenesis was also investigated.

MATERIAL AND METHODS

Blood sampling

Peripheral blood samples were obtained from eleven clinically healthy dogs (average age 15.2 months) and three dogs with generalized demodicosis (GD) (average age 30.7 months) by *v. cephalica* puncture and placed into a tube containing heparin (20 units/ml of blood).

Preparation of lymphocyte culture and mitogen stimulation

The heparinized blood was diluted with phosphate buffered saline (PBS) at a ratio 1 : 3. The lymphocytes

were isolated by the method described by Procházková (1979). Separated cells were washed 3 times with RPMI-1640 medium (Sebak GmbH, Germany) and resuspended in culture medium to give 1×10^6 cells per ml. RPMI-1640 medium supplemented with penicillin - 200 u/ml, streptomycin - 200 µg/ml and 15% dog serum (unless otherwise indicated) was used as a culture medium for lymphocytes in all investigations. Viability of the lymphocytes exceeded 95%, as determined by trypan blue exclusion. The majority (> 95%) of the isolated cells were defined as mononuclear cells. Five hundred microlitres of the lymphocyte suspension were placed into polyethylene tube and 500 µl of mitogen (diluted in culture medium) was added. As a control, 500 µl of the culture medium was added instead of the mitogen. Concanavalin A (Con A; Sigma Chemical Co., USA) and phytohemagglutinin (PHA-P; Sigma Chemical Co., USA) at the optimum concentration 25 µg/ml and 20 µg/ml for dog (Tajima et al., 1990), respectively, were used as stimulators. The cultures were set up in duplicate and incubated at 37 °C and 5% CO₂ in humidified air for 96 hours.

Ethidium bromide (EB) fluorescence assay

The measurement of DNA in cultured lymphocytes was determined according to Nakanishi et al. (1986). Briefly, cells after incubation were washed in PBS with centrifugation at 1,500 rpm for 10 minutes at room temperature and cell pellets were solubilized with 2 ml of Sodium dodecyl sulphate (SDS; Aldrich Chemie, Germany) solution (0.125 mg/dl in PBS). The samples were kept at room temperature for 30 minutes with occasional stirring with a vortex mixer to expose DNA. Afterward, 2 ml of EB (Aldrich Chemie, Germany) solution (7.5 µg/ml in PBS) was added and mixed thoroughly. Mixtures without lymphocytes were used as control (background FI). Fluorescence intensity (FI) was measured by a spectrofluorophotometer (Jasco FP-550, Japan) at Ex = 525 nm and Em = 600 nm. Results are expressed as FI and stimulation index (SI). SI was calculated as follows (Nagahata et al., 1986); $SI = (A - C) / (B - C)$; where A is mean FI with mitogen; B is mean FI without mitogen; C is background FI (EB and SDS solutions mixed; FI = 3.6-5.6).

Experimental design

Lymphocyte blastogenic responses to Con A of five clinically healthy dogs (average age 7.4 months) were compared using autologous serum (AS) and fetal calf serum (FCS; Sebak GmbH, Germany). In these dogs, the blastogenic responses to Con A and PHA of lymphocytes cultured in AS were also compared. Effect of serum from three dogs with GD (GDS) was investigated on the lymphocyte blastogenesis in six clinically healthy dogs (average age 1.8 years); i.e. serum from one GD dog was tested in two normal dogs. GDS were stored at -20 °C (max. for 5 weeks) until their use. In

three dogs (8 months, 1.5 and 5.5 years old) with GD (persisted 1–2 months), the *in vitro* lymphocyte response to Con A after treatment with AS (i.e. GDS) and pooled homologous serum (i.e. normal dog serum – NDS) was also examined. Pooled dog serum was derived by mixing sera from three healthy dogs (2–3 years old). In addition, the lymphocyte blastogenesis of these eleven healthy dogs was compared when they were divided into two groups according to age or different time of examination.

Statistics

Data obtained were expressed as mean \pm standard deviation and analysed by Student's *t*-test. Coefficient of variation (CV) was also calculated, if necessary. Only $P = 0.05$ or smaller was considered statistically significant.

RESULTS

In examination of serum effect on lymphocyte blastogenesis in five healthy dogs, AS and FCS were used (Tab. I). Maximum FI and SI values were determined in the culture with addition of AS. There is a great difference among these values using FCS. CV in both parameters of blastogenesis of lymphocytes cultured in the presence of FCS were much higher (0.667 and 0.403) in comparison to CV (0.015 and 0.135) of those in the presence of AS. Therefore, we used dog serum only in further experiments. In these five dogs, the blastogenic responses to Con A and PHA of lymphocytes cultured in the presence of AS were examined. The values of FI and SI were strongly similar, as both mitogens were compared (Tab. II).

I. Blastogenesis of lymphocytes to Con A cultured with autologous serum and fetal calf serum in normal dogs

Dog No.	Autologous serum			Fetal calf serum		
	FI-SC	FI-USC	SI	FI-SC	FI-USC	SI
1	10.05	1.45	6.93	10.5	1.75	5.74
2	10.35	1.45	7.13	3.45	0.85	4.05
3	10.05	1.15	8.73	1.55	0.65	2.38
4	9.95	1.05	9.47	11.25	1.55	7.25
5	10.15	1.15	8.82	5.15	1.35	3.81
Mean	10.11	1.25	8.18	6.29	1.23	4.66*
\pm SD	0.15	0.19	1.11	4.20	0.47	1.88
CV	0.015	0.152	0.135	0.667	0.382	0.403

FI-SC = fluorescence intensity of stimulated cells; FI-USC = FI of unstimulated cells; SI = stimulation index; CV = coefficient of variation

* = $P < 0.025$

In eleven healthy dogs, the lymphocyte response to Con A using AS was compared with respect to the age and the time of examination. The blastogenesis of lymphocytes obtained from younger dogs was slightly higher, but without significance (Tab. III). Likewise, no significant difference was observed in the amount of stimulation elicited by Con A comparing lymphocytes obtained from two groups of dogs (FI = 10.11 ± 0.15 and SI = 8.18 ± 1.11 in Tab. I; FI = 11.58 ± 2.52 and SI = 7.83 ± 2.24 in Tab. IV) investigated in the two different periods.

Tab. IV shows the amount of stimulation of peripheral lymphocytes in response to Con A for the various combinations of cells and serum from normal dogs and dogs with GD. When lymphocytes of these groups of dogs were cultured in the presence of GDS, the blastogenic response to mitogen was significantly ($P < 0.025$ – 0.005) depressed in comparison to that in normal dogs using AS. This difference of SI values represented 40.6% suppression in normal lymphocytes and 81.2% suppression in lymphocytes from dogs with GD. Moreover, significant ($P < 0.05$ for SI and $P < 0.01$ for FI-SC) difference in blastogenesis between lymphocytes from dogs with GD using NDS and lymphocytes from normal dogs using AS was also observed. In contrast, the response of lymphocytes from dogs with GD cultured in the presence of NDS was only little higher ($P > 0.05$) than the response of those cultured in the presence of AS (i.e. GDS). In addition, when cultured in the presence of GDS, the blastogenesis of lymphocytes obtained from dogs with GD was more (significantly in the SI value) depressed in comparison to that in normal dogs. The GD dogs showed an increased proliferation of unstimulated lymphocytes, regardless of the addition of AS or NDS to the culture medium, as comparing to that of normal dogs.

II. Lymphocyte blastogenic response to Con A and PHA in normal dogs

	Mitogens	
	Con A	PHA
FI-SC	10.11 ± 0.15^a	10.15 ± 0.10
SI	8.18 ± 1.11 ($n = 5$) ^b	8.26 ± 1.19 ($n = 5$)

^amean \pm SD; ^bnumber of dogs; FI-SC and SI – see Tab. I

III. Influence of different age on lymphocyte blastogenesis to Con A in normal dogs

	Average age of dogs		$P <$
	0.5 years	2.6 years	
FI-SC	11.15 ± 1.86^a	10.34 ± 2.07	NS
SI	8.59 ± 1.55 ($n = 7$) ^b	6.95 ± 1.73 ($n = 4$)	NS

For symbols a, b see Tab. II; NS = not significant

IV. Lymphocyte blastogenic response to Con A for the various combination of cells and serum from normal dogs and dogs with generalized demodicosis

Culture from dogs		Fluorescence intensity		Stimulation index
Cells	Serum	SC	USC	
¹ N	A	11.58 ± 2.50	1.59 ± 0.59	7.83 ± 2.24
² N	D	6.06 ± 2.08	1.45 ± 0.69	4.65 ± 1.41
³ D	N	4.01 ± 2.09	2.22 ± 1.71	2.93 ± 2.22
⁴ D	D	3.70 ± 2.67	2.36 ± 1.15	1.47 ± 0.44
Significance (P)				
1 vs. 2		<0.005	NS	<0.025
1 vs. 3		<0.01	NS	<0.05
1 vs. 4		<0.01	NS	<0.005
2 vs. 3		NS	NS	NS
2 vs. 4		NS	NS	<0.025
3 vs. 4		NS	NS	NS

N (cells) = normal dog (n = 6); N (serum) = mixed serum from three healthy dogs; D (cells) and serum = demodicosis affected dogs (n = 3); A = autologous; SC = stimulated cells; USC = unstimulated cells; NS = not significant

DISCUSSION

The serums from dogs with GD were shown to significantly inhibit the *in vitro* reactivity to Con A of lymphocytes from normal dogs. These findings support the results of other authors (Hirsh et al., 1975; Scott et al., 1976; Krawiec and Gaafar, 1980) that serum factors present in active cases of demodicosis are depressing response of T-lymphocytes to mitogens. However, when lymphocytes were cultured in the presence of GDS, there was a higher percentage of suppression of blastogenesis in GD dogs (81.2%) than that in normal dogs (40.6%), in comparison to blastogenesis of lymphocytes from normal dogs with AS added (Tab. IV). As a result, the degree of *in vitro* lymphocyte blastogenesis suppression in GD dogs did not paralleled the immunosuppressive potency of their serum. Similar observation in GD dogs was also reported by Corbett et al. (1975). In our experiment, one explanation for this phenomenon can be that the GDS were stored (-20 °C) three to five weeks before their use.

Furthermore, lymphocytes from GD dogs responded to Con A significantly slighter than normal dog lymphocytes, when cultured in the presence of NDS or AS, respectively. Similar observation in one third of investigated GD dogs was also reported by other authors (Hirsh et al., 1975) and they indicated that because of the extreme variation in responsiveness to mitogen between the cells of these groups of dogs, differences may have been masked. The basis for this hyporeactivity is unknown. Whether this was due to the age of the dog, the disease itself, or both, is not clear (Hirsh et al., 1975).

It does not appear that the age or the chronicity of the disease are related to our observation. Moreover, our dogs before examination were not on steroid therapy. One might possibly conclude from this that, in

addition to serum factors, there may also be a cellular modified response to the Con A. These findings require confirmation with more dogs.

The suppression of blastogenesis of stimulated lymphocytes from GD dogs was accompanied by an increase in cell mitogenesis in media without the Con A. The meaning of this is not clear at present, but depression of the Con A response in coincidence with enhancement of the transformation of unstimulated cells suggests that the parasite or the host's reactivity to the parasite can be depressive or stimulating on different subsets of lymphocytes. Con A and PHA are stimulants of T-lymphocytes in dogs (Krakowka, 1987). Although the subpopulations of canine blood lymphocytes which are induced to transformation by those mitogens are not a strict separated at this time, experimental evidence suggests that the lymphocytes responsive to PHA exhibit a helper function and those reacting to Con A appear to be less mature than helper T-cells, have suppressive and cytotoxic functions (Stobo, 1980). Barta and Oyekan (1981) reported that some infectious diseases associated with the presence of serum lymphocyte mitogenesis suppressing factors are accompanied by an increase in the cpm of unstimulated cells, which may indicate recruitment of younger cellular forms from the depot of the hematopoietic tissue (Barta, 1981). The increased proliferation of unstimulated lymphocytes was observed not only in GD dogs, but also in dogs with localized demodicosis (Barriga et al., 1992).

In vitro lymphocyte stimulation is subject to various factors causing some variability. The test day appeared to be one of the sources of variation (Buckley, 1976). In swine it was observed using ³H-thymidine incorporation assay (Joling et al., 1993). No significant difference in the lymphocyte responsiveness to Con A in healthy dogs examined in the two different

periods using EB fluorescence assay was observed. It is evident, as a measure of the lymphocyte response to mitogens, that the EB fluorescence assay was proved to be less variable than ^3H -thymidine uptake assay (Nagahata et al., 1986). Moreover, Sabbe et al. (1983) reported that in lymphocyte proliferation intrinsic differences in the tested cells were more relevant than biological differences. According to Barta and Oyekan (1981), the response of the canine blood lymphocytes to mitogens is dependent on a number of regulatory factors, which obviously vary slightly with time and considerably with infectious diseases.

No difference in response of lymphocytes to Con A was observed between the animals of two different ages (4–10 months and 1.5–4.0 years old, respectively). Previous studies showed that lymphocytes from healthy puppies respond to mitogens normally when they are three months old (Gerber and Brown, 1974). It was documented that the lymphocyte response decreases with increasing age (Gerber and Brown, 1974) and significant suppression of those in dogs older than nine years of age was observed (Schultz and Adams, 1978). If the age is a factor of importance in mitogen responsiveness of lymphocytes, our data does not reveal it. A change in the experimental design, such as extension of the age period, may reveal a possible effect of age more clearly.

The effect of cultivation of canine peripheral blood lymphocytes in the presence of AS and FCS on EB fluorescence assay was examined. The great difference in lymphocyte blastogenesis values between the dogs by using FCS suggested that the use of FCS might lead to an erroneous judgement. Normal homologous serum is presumed to make canine lymphocytes show higher responsiveness than FCS (Barta et al., 1982; Nakanishi et al., 1986). In this examination, ASs showed a better responsiveness of lymphocytes than FCS and no remarkable differences have been found between ASs.

Both lectins, Con A and PHA, induced cell proliferation in very similar amount. Other authors also showed that the values of lymphocyte responses to these mitogens in healthy dogs were in similar ranges, but according to Barta and Oyekan (1981) and Barriga et al. (1992) higher with Con A, according to AL-Khalidi and Barriga (1986) higher with PHA.

The optimum concentration of mitogen for lymphocyte blastogenesis is variable according to each animal species. There is evidence that the relationship between the optimum concentration of mitogen which induces maximal lymphocyte blastogenic response and the receptor occupancy by mitogen exists in dog (Tajima et al., 1990). Therefore, not the disparity between proliferation data after Con A and PHA stimulation of lymphocytes in our study may be reflection by a optimum concentration used.

EB fluorescence assay is thought to be possible to be used instead of the radioisotope incorporation assay

for evaluation of blastogenic response of lymphocytes from healthy cows (Nagahata et al., 1986), equine (Tajima et al., 1987) and swine (Inoue et al., 1987). The main advantages of this assay are safety, simplicity and reliability, while results are more easily reproduced (Nagahata et al., 1986). The results in this paper have suggested that EB fluorescence assay is a useful method of detection of a depressed responsiveness of canine lymphocyte blastogenesis to mitogens.

REFERENCES

- AL-KHALIDI, N. W. – BARRIGA, O. O.: Cell-mediated immunity in the prepatent primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*. *Vet. Immunol. Immunopath.*, *11*, 1986: 73–82.
- BARRIGA, O. O. – AL-KHALIDI, N. W.: Humoral immunity in the prepatent primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*. *Vet. Immunol. Immunopath.*, *11*, 1986: 375–389.
- BARRIGA, O. O. – AL-KHALIDI, N. W. – MARTIN, S. – WYMAN, M.: Evidence of immunosuppression by *Demodex canis*. *Vet. Immunol. Immunopath.*, *32*, 1992: 37–46.
- BARTA, O.: Laboratory techniques of veterinary clinical immunology: a review. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, *4*, 1981: 131–160.
- BARTA, O. – OYEKAN, P. P.: Lymphocyte transformation test in veterinary clinical immunology. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, *4*, 1981: 209–221.
- BARTA, O. – WALTMAN, C. – SHAFFER, L. M. – OYEKAN, P. P.: Effect of serum on lymphocyte blastogenesis. I. Basic characteristics of action by diseased dog serum. *Vet. Immunol. Immunopath.*, *3*, 1982: 67–83.
- BUCKLEY, R. H.: The functions and measurement of human B- and T-lymphocytes. *J. Investig. Dermatol.*, *67*, 1976: 381–390.
- CORBETT, R. – BANKS, K. – HINRICHS, B. – BELL, T.: Cellular immune responsiveness in dogs with demodectic mange. *Transpl. Proc.*, *7*, 1975: 557–559.
- GERBER, J. D. – BROWN, A. L.: Effect of development and aging on the response of canine lymphocytes to phytohemagglutinin. *Infect. Immun.*, *10*, 1974: 695–699.
- HIRSH, D. C. – BAKER, B. B. – WIGER, N. – YASKULSKI, S. G. – OSBURN, D.: Suppression on *in vitro* lymphocyte transformation by serum from dogs with generalized demodicosis. *Amer. J. Vet. Res.*, *36*, 1975: 1591–1595.
- INOUE, T. – TSUKAMOTO, H. – GOTO, N. – MATSUMURA, K.: Application of ethidium bromide fluorescence assay to measurement of blastogenesis of swine lymphocytes. *Jpn. J. Vet. Sci.*, *49*, 1987: 681–686.
- JOLING, P. – WEVER, P. J. M. – OSKAM, J. P. H. – HENKIN, A. M.: Lymphocyte stimulation by phytohaemagglutinin and concanavalin A in different swine breeds. *Livest. Prod. Sci.*, *35*, 1993: 341–350.
- KRAKOWKA, S.: *In vitro* and *in vivo* methods in immunotoxicology. *Toxicol. Path.*, *15*, 1987: 276–280.
- KRAWIEC, D. R. – GAAFAR, S. M.: Studies on the immunology of canine demodicosis. *J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.*, *16*, 1980: 669–676.

- MEDLEAU, L. – CROWE, D. T. – DAWE, D. L.: Effect of surgery on the *in vitro* response of canine peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin. *Amer. J. Vet. Res.*, **44**, 1983: 859–860.
- NAGAHATA, H. – YOKATA, H. – NODA, H.: A simple fluorometric microassay of DNA in mononuclear cell preparations using ethidium bromide. *Jpn. J. Clin. Chem.*, **13**, 1984: 109–113.
- NAGAHATA, H. – NODA, H. – ABE, T.: Evaluation of bovine lymphocyte blastogenic response by fluorometric DNA synthesis assay. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **48**, 1986: 23–28.
- NAKANISHI, A. – AIMI, K. – EJIMA, H. – KUROKAWA, K.: Measurement of blastogenesis of canine peripheral blood lymphocytes against PHA by glucose consumption test. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **48**, 1986: 53–60.
- PROCHÁZKOVÁ, A.: Separation of lymphocytes by means of verografin. *Immunol. Zprav.*, **2**, 1979: 17–19.
- SABBE, J. M. – DeBODE, L. – Van ROOD, J. J.: Analysis of variability in lymphocyte transformation tests. *J. Immunol. Meth.*, **57**, 1983: 21–32.
- SCOTT, D. W. – FARROW, B. R. H. – SCHULTZ, R. D.: Studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. *J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.*, **10**, 1974: 233–244.
- SCOTT, D. W. – SCHULTZ, R. D. – BAKER, E.: Further studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. *J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.*, **12**, 1976: 203–213.
- SCHULTZ, R. D. – ADAMS, L. S.: Immunology methods for the detection of humoral and cellular immunity. *Vet. Clin. N. Amer.*, **8**, 1978: 721–753.
- SINGER, S. J.: Molecular biology of cellular membranes with applications to immunology. In: DIXON, F. J. – KUNKEL, H. G. (ed.): *Adv. Immunol.*, **19**, New York, Academic Press 1974: 56–59.
- STOBO, J. D.: Mitogens. *Clin. Immunol.*, **4**, 1980: 55–72.
- TAJIMA, M. – FUJINAGA, T. – KOIKE, T. – OKAMOTO, Y. – OTOMO, K.: Assay for equine peripheral blood lymphocytes blastogenic response using ethidium bromide. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 1987: 567–570.
- TAJIMA, M. – FUJINAGA, T. – OKAMOTO, Y. – OTOMO, K. – KOIKE, T.: Relationship between mitogen receptors in peripheral blood lymphocytes and blastogenic responses to mitogen. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 1990: 1–5.
- WIKEL, S. K.: Immunomodulation of host responses to ectoparasite infestation – an overview. *Vet. Parasitol.*, **14**, 1984, 321–339.

Arrived on 22nd May 1995

Contact Address:

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

EFFECT OF COPPER ON THE IMMUNE RESPONSES OF GUINEA PIGS WITH EXPERIMENTAL ASCARIOSIS

VPLYV MEDI NA IMUNITNÉ PREJAVY MORČIAT PRI EXPERIMENTÁLNEJ ASKARIÓZE

Z. Borošková, J. Šoltýs, M. Benková

Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: A subchronic effect of copper on selected immunological parameters was studied in guinea pigs with experimental ascariasis (*Ascaris suum*). CuSO₄ given orally for 28 days moderately increased T and B cells in the animal lymphoid organs. CH⁵⁰ and AH⁵⁰ complement levels remained unchanged during CuSO₄ administration. A subsequent infection of subchronically intoxicated guinea pigs caused a repeated insignificant stimulation of B cell values while the percentage of T cells was not increased. On the contrary, the complement levels increased significantly in intoxicated infected animals, namely CH⁵⁰ levels from day 5 to day 15 and AH⁵⁰ levels from day 1 to day 7 post infection. No statistically significant differences were observed in comparison with infected non-intoxicated guinea pigs. The lean intensity of infection evoked by *A. suum* larvae migrating in the lungs of intoxicated animals was 29% lower than in control.

copper; T and B cells; complement; antibodies; *Ascaris suum*; guinea pig

ABSTRAKT: Sledoval sa subchronický vplyv medi na vybrané imunologické parametre pri experimentálnej askarióze (*Ascaris suum*) morčiat. Zistilo sa, že po 28-dňovom perorálnom aplikovaní CuSO₄ došlo k miernemu zvýšeniu hodnôt T a B buniek v lymfoidných orgánoch zvierat. Hladina komplementu CH⁵⁰ a AH⁵⁰ počas podávania CuSO₄ ostala nezmenená. Následné infikovanie subchronicky intoxikovaných morčiat spôsobilo opätovnú nevýraznú stimuláciu hodnôt B buniek, kým zastúpenie T buniek sa nezvyšilo. Naproti tomu hodnoty komplementu preukazne vzrástli u intoxikovaných a infikovaných zvierat, a to pri CH⁵⁰ od 5. do 15. dňa a pri AH⁵⁰ od 1. do 7. dňa po infikovaní, pričom rozdiely, v porovnaní s len infikovanými morčiatami, neboli štatisticky významné. Priemerná intenzita infekcie migrujúcimi larvami askarid v pľúcach intoxikovaných zvierat bola nižšia o 29 %, v porovnaní s kontrolou.

meď; T a B bunky; komplement; protilátky; *Ascaris suum*; morča

ÚVOD

Význam medi pre metabolizmus ľudí a zvierat je relatívne dobre známy. Tento esenciálny prvok je nepostrádateľnou súčasťou viacerých metaloenzýmov v organizme, potrebných k udržiavaniu optimálnej homeostázy vnútorného prostredia (Bencko a i., 1991). Na druhej strane je meď aj jedným zo závažných polutantov životného prostredia a prijímaná v nadbytku môže poškodiť fyziologické funkcie živých organizmov. Známe sú zmeny v metabolizme zvierat po intoxikácii meďou a synergický, ako aj antagonistický vzťah tohto prvku k ostatným mikroelementom (Cabađaj a Gdovin, 1970; Ilussein a i., 1985; Bíreš, 1989). Menej preskúmané je pôsobenie medi na imunitný systém vo vzťahu k infekcii. Deplécia tohto ťažkého kovu v potrave môže spôsobiť poruchu imunologickej rovnováhy a tým zníženie obranyschopnosti organizmu voči ochoreniam (Jones a Symons, 1982; Philips a i., 1982).

Cieľom našej práce bolo preskúmať vplyv subchronickej intoxikácie CuSO₄ na T a B bunky, hladinu komplementu a špecifických protilátok pri experimen-

tálnej askarióze morčiat. Zároveň sme u tých istých zvierat preskúmali vplyv tejto zlúčeniny na priemernú intenzitu infekcie migrujúcimi larvami askarid v pľúcach.

MATERIÁL A METÓDY

Zvieratá a rozdelenie experimentov

Pokusy sme robili na 127 morčatách, o hmotnosti 250–300 g (Veľkočov laboratórnych zvierat, Praha), chovaných v laboratórnych podmienkach (23 °C, 60–70 % vlhkosti) a kŕmených komerčnou zmesou pre morčatá *ad libitum*.

Sledovanie imunologických ukazovateľov

T a B lymfocyty, aktivitu komplementu a cirkulujúce protilátky v sére, sme sledovali na troch skupinách morčiat, pričom v 1. skupine bolo po 39 a v 2. a 3. skupine po 44 zvierat.

Prvej skupine morčiat bol podávaný CuSO_4 od 1. po 28. deň pokusu, bez experimentálneho infikovania.

V druhej skupine zvieratá dostávali CuSO_4 v rovnakej dobe ako morčatá v 1. skupine a 24 hodín po poslednom podaní zlúčeniny boli zvieratá experimentálne infikované 3 000 vajíčkami *Ascaris suum* na morča.

Tretia skupina bola experimentálne infikovaná vajíčkami *A. suum* v dávke 3 000 vajíčok na morča, bez podávania CuSO_4 .

CuSO_4 bol podávaný morčatám *per os* v želatínových tobolkách v dávke 2,080 μg na kg ž. h. jedenkrát denne od 1. po 28. deň experimentu. Uvedená dávka a zlúčenina bola ekvivalentná obsahu Cu v priemyselnej imisii ťažkých kovov a iných prvkov, získanej vo vzdialenosti 5 km od závodu na výrobu medi (Borová a i., 1993).

Vajíčka *A. suum* izolované z uteru pohlavne zreých samičiek, boli kultivované v 0,1 M NaOH pri laboratórnej teplote. Na nakazenie boli použité 28-dňové infekčné vajíčka.

Percentuálne zastúpenie T a B lymfocytov v lymfoidných orgánoch (hepatálne, mediastinálne, mezenterálne lymfatické uzliny a slezina), cirkulujúce protilátky a aktivitu komplementu v sére morčiat, sme vyhodnotili pred prvým podaním CuSO_4 (1. deň pokusu), na 7., 14., 21. a 28. deň jeho podávania a na 1., 5., 7., 9., 12., 15., 19. a 22. deň po infikovaní vo všetkých troch skupinách morčiat. Každý uvedený deň sme zabili po tri morčatá a vzorky jednotlivých lymfoidných orgánov a sér sme poolovali.

Vplyv CuSO_4 na intenzitu infekcie sme vyhodnotili na piatich morčatách 2. skupiny a piatich morčatách 3. skupiny. Na 7. deň po infikovaní sme z pľúc oboch skupín morčiat získali larvy Baermannovou metódou (Manual of veterinary parasitological laboratory techniques, 1986).

E a EAC rozetová metóda na detekovanie T a B lymfocytov

T bunky boli detekované rozetovou metódou podľa Winchestera a Rossa (1987). Čistá suspenzia lymfocytov, izolovaných Ficollom Paque (Pharmacia LKB), v koncentrácii $10^6/0,1$ ml bola zmiešaná s rovnakým objemom bovinného fetálneho séra a s dvojnásobným objemom 0,5% suspenzie králičích erytrocytov.

B lymfocyty boli určené EAC rozetovou metódou podľa Winchestera a Rossa (1987). Suspenzia lymfoidných buniek, v koncentrácii $10^6/0,1$ ml, bola zmiešaná s rovnakým objemom 5% suspenzie baraních erytrocytov, ku ktorým bol pridaný vytitrovaný komerčný hemolytický amboceptor proti baraním erytrocytom a komplement (Ústav sér a očkovacích látok, Praha). E a EAC rozety sme hodnotili mikroskopicky.

Komplement aktivovaný klasickou (CH^{50}) a alternatívnou cestou (AH^{50})

Hodnoty CH^{50} sme stanovili s baraniami erytrocytami senzibilizovanými amboceptorom (inaktivované

králičie sérum) a inkubovali s vyšetrovanými sérami v riedení 1 : 2 až 1 : 126, pri teplote 37 °C 60 minút (Staršia a Stefanovič, 1977). Pri stanovení hodnôt AH^{50} sme použili nesenzibilizované králičie erytrocyty vo veronalovom pufré s EGTA, ktoré sme inkubovali 30 minút pri teplote 37 °C s vyšetrovanými sérami v riedení ako pri stanovení CH^{50} (Lochman, 1983).

Špecifické cirkulujúce protilátky

Hladinu špecifických protilátok v krvi morčiat sme stanovili metódou ELISA podľa Mančala (1986). Použili sme antigén v riedení 1 : 200, získaný ultrazvukovou dezintegráciou L_3 lariev *A. suum*.

Štatistické hodnotenie experimentov

Štatistickú významnosť výsledkov sme hodnotili Studentovým *t*-testom.

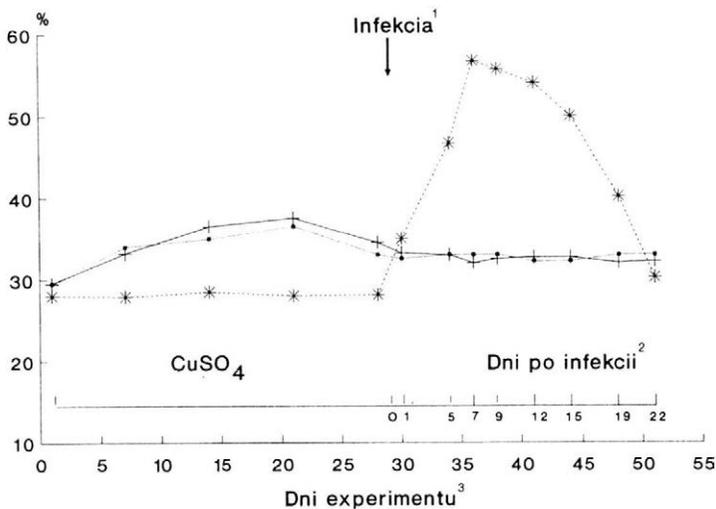
VÝSLEDKY

T bunky

V 1. a 2. skupine morčiat došlo po aplikovaní CuSO_4 len k miernemu signifikantnému nárastu hodnôt T bunkovej populácie vo všetkých lymfoidných orgánoch od 7. do 21. dňa experimentu, v porovnaní s východiskovou hodnotou. Od 21. dňa až do ukončenia pokusu hodnoty T lymfocytov mierne poklesli, a to v oboch sledovaných skupinách. Po infikovaní zvierat v 2. skupine nedošlo k zvýšeniu hodnôt T buniek v lymfoidných orgánoch a výraznejšie rozdiely v priebehu kriviek 1. a 2. skupiny sme nezaznamenali v celom priebehu experimentu. U 3. skupiny morčiat sa od 1. dňa po infikovaní hodnoty T lymfocytov výrazne zvýšili, s maximom na 7. deň a prudkým poklesom ku 22. dňu po infikovaní. Rozdiel v hodnotách 3. skupiny, v porovnaní s 1. a 2. skupinou bol štatisticky signifikantný ($P < 0,01$) od 5. do 19. dňa po infikovaní (obr. 1).

B bunky

Aj pri B bunkovej populácii sme zistili obdobný priebeh kriviek v 1. a 2. skupine počas aplikovania CuSO_4 , s tým rozdielom, že v porovnaní s východiskovou hodnotou, boli hodnoty B buniek signifikantne ($P < 0,01$) vyššie vo všetkých lymfoidných orgánoch od 7. do 28. dňa experimentu. V 2. skupine *p. i.* hodnoty týchto lymfoidných buniek po infikovaní len mierne, nesignifikantne vzrástli, v porovnaní s 1. skupinou. Naproti tomu v 3. skupine došlo už na 1. deň *p. i.* k prudkému ($P < 0,01$) nárastu hodnôt, s maximom na 9. deň a poklesom ku 22. dňu po infikovaní (obr. 2).



1. Priemerné hodnoty T buniek v lymfoidných orgánoch morčiat po 28-dňovom podávaní CuSO_4 pri experimentálnej askarióze – Average values of T cells in lymphoid organs of guinea pigs after 28-day application of CuSO_4 at experimental ascariosis

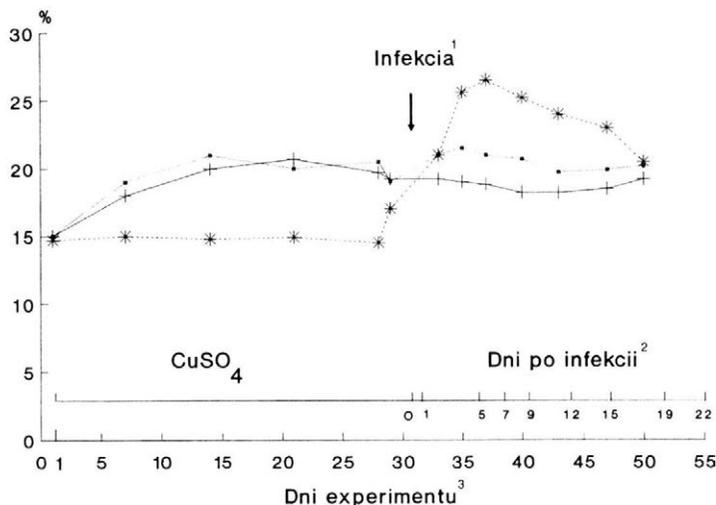
Legenda k obr. 1 až 5 – Legend to Figs. 1 to 5:

○ 1. skupina: podávanie CuSO_4 ($n = 3$) – group 1: application of CuSO_4 ($n = 3$)

■ 2. skupina: podávanie CuSO_4 a infikovanie vajčkami *A. suum* ($n = 3$) – group 2: application of CuSO_4 and *A. suum* egg infection ($n = 3$)

* 3. skupina: infikovanie vajčkami *A. suum* ($n = 3$) – group 3: *A. suum* egg infection ($n = 3$)

¹infekcia, ²dni po infekcii, ³dni experimentu



2. Priemerné hodnoty B buniek v lymfoidných orgánoch morčiat po 28-dňovom podávaní CuSO_4 pri experimentálnej askarióze – Average values of B cells in lymphoid organs of guinea pigs after 28-day application of CuSO_4 at experimental ascariosis

For 1–3 see Fig. 1

CH⁵⁰

Hladina CH⁵⁰ v 1. skupine morčiat nepatrne vzrástla od 7. do 14. dňa po podávaní CuSO_4 , v porovnaní s východiskovou hodnotou. V ďalších dňoch mala krivka uvedeného imunologického ukazovateľa kolísavý priebeh.

K miernemu nesignifikantnému zvýšeniu aktivity CH⁵⁰ došlo aj v 2. skupine od 7. dňa po podávaní CuSO_4 . Výrazný nárast hodnôt sme zistili po infikovaní zvierat, s maximom na 7. deň. V ďalších dňoch odberu hladina CH⁵⁰ postupne klesala až k 22. dňu po infikovaní.

V 3. skupine morčiat hladina CH⁵⁰ sa z počiatočnej hodnoty na 1. deň znížila do 5. dňa *p. i.* V ďalších dňoch hodnoty CH⁵⁰ postupne narastali až do ukončenia pokusu.

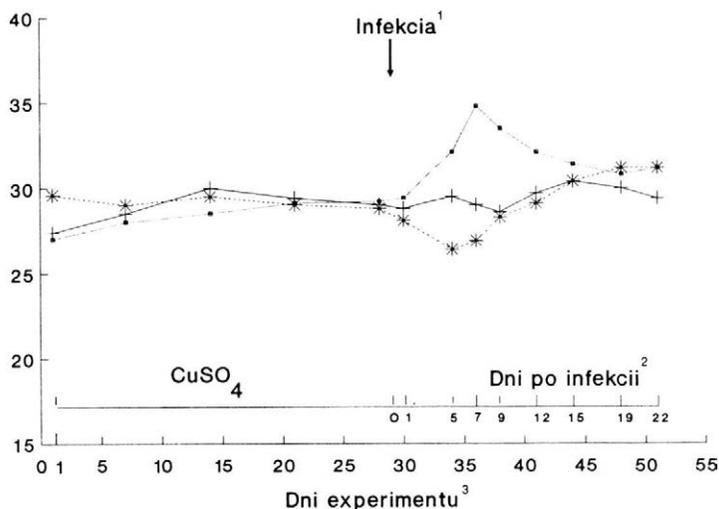
Štatisticky významné ($P < 0,01$) zvýšenie hladiny CH⁵⁰ sme zaznamenali v 2. skupine morčiat od 1. do 15. dňa *p. i.*, v porovnaní s 3. skupinou morčiat (obr. 3).

AH⁵⁰

Obdobný priebeh kriviek sme zistili aj pri sledovaní vplyvu CuSO_4 na AH⁵⁰ s tým rozdielom, že v 2. skupine morčiat po infikovaní došlo, v porovnaní s CH⁵⁰, k výraznejšiemu zvýšeniu hodnôt hladiny komplementu už na 1. deň *p. i.*, s poklesom k 7. dňu po infikovaní (obr. 4).

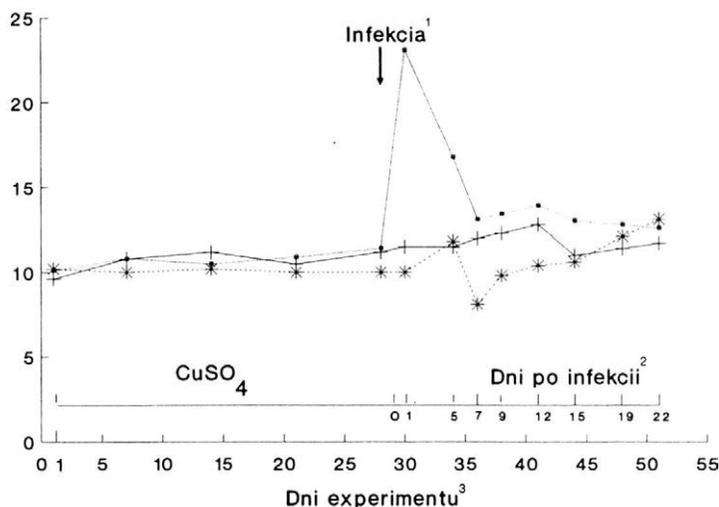
Špecifické cirkulujúce protilátky

Po infikovaní 2. a 3. skupiny morčiat hodnoty protilátok od 2. dňa postupne vzrástli a dosiahli maximum



3. Hladina komplementu morčiat, aktivovaného klasickou cestou (CH⁵⁰) po 28-dňovom podávaní CuSO₄ pri experimentálnej askarióze – Complement levels in guinea pigs, activated by a traditional route (CH⁵⁰) after 28-day application of CuSO₄ at experimental ascariosis

For 1–3 see Fig. 1



4. Hladina komplementu morčiat, aktivovaného alternatívnou cestou (AH⁵⁰) po 28-dňovom podávaní CuSO₄ pri experimentálnej askarióze – Complement levels in guinea pigs, activated by an alternative route (AH⁵⁰) after 28-day application of CuSO₄ at experimental ascariosis

For 1–3 see Fig. 1

v 2. skupine na 19. a v 3. skupine na 22. deň po infikovaní.

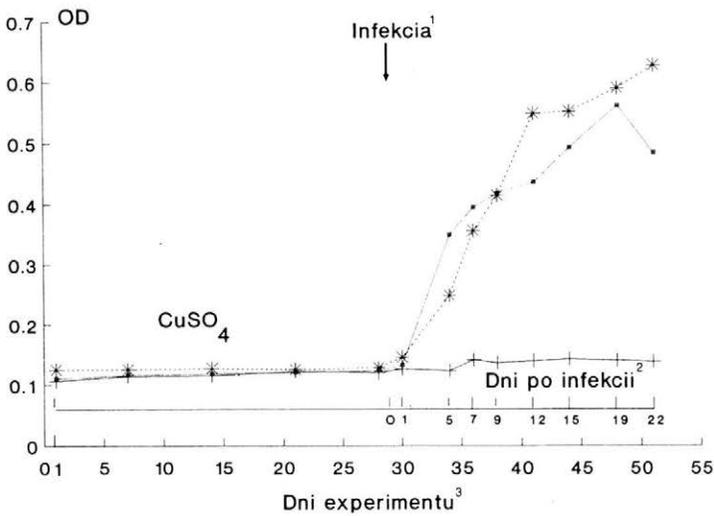
V 2. skupine sme zaznamenali o niečo rýchlejši nástup protilátkovej aktivity od 7. do 9. dňa *p. i.*, v porovnaní s 3. skupinou. V ďalšom priebehu infekcie hladina protilátok v 2. skupine, v porovnaní s 3. skupinou mierne poklesla.

Vplyv na priemernú intenzitu infekcie

Priemerná intenzita infekcie migrujúcimi larvami *A. suum* v pľúcach morčiat po exponovaní CuSO₄ a infikovaní, bola nižšia o 29 %, v porovnaní so skupinou, ktorej nebola aplikovaná zlúčenina medi.

DISKUSIA

Doterajšie, i keď ojedinelé poznatky o účinku medi na imunitný systém v súvislosti s pasienkovými helmintózami hospodárskych zvierat naznačujú, že tento esenciálny prvok má význam v imunitných mechanizmoch (Yong a i., 1985; Huckers a Yong, 1986). Podľa poznatkov Bremmera a Keitha (1959) deficit medi v potrave zvierat má za následok zvýšené vylučovanie vajčiek helmintov vo výkaloch hovädzieho dobytku, čo autori dávajú do priameho súvisu so znížením obranyschopnosti hostiteľov. Deplécia medi v potrave spôsobuje u experimentálnych zvierat zníženie protilátkovej aktivity, imunosupresiu a tým zvýšenú vnímavosť aj k ochoreniam vírusovej etiológie



5. Dynamika cirkulujúcich protilátok v periférnej krvi morčiat po 28-dňovom podávaní CuSO_4 pri experimentálnej askarióze – Dynamics of circulating antibodies in the peripheral blood of guinea pigs after 28-day administration of CuSO_4 at experimental ascariosis

For 1–3 see Fig. 1

(Lukasewytz a Pohanka, 1981; Wagner a Wagnerová, 1988). V malých dávkach je tento nutričný faktor síce efektívnym stimulatorom imunity, ale včasný imunostimulačný účinok je spravidla vystriedaný potlačením imunitnej odpovedi (Bruin, 1980; Wagner a Wagnerová, 1988).

Z prezentovaných výsledkov vyplýva, že 28-dňová perorálna aplikácia medi len nevýrazne zvýšila zastúpenie T a B buniek v lymfoidných orgánoch morčiat. Ďalší mierny nárast B lymfocytov sme zaznamenali po infekcii, kým T bunky na antigénny stimul infikovaním hostiteľov *A. suum*, nereagovali. Obidve bunkové populácie (T a B) majú nezastupiteľný význam najmä v regulačných mechanizmoch imunity nielen pri askarióze, ale aj pri iných helmintózach (Soulsby, 1987). Významnejšie rozdiely v hodnotách týchto imunokompetentných buniek v jednotlivých sledovaných lymfoidných orgánoch, ktoré sú zahrnuté do lymforetikulárnej osi počas migrácie lariev askariíd v hostiteľovi, sme nezistili.

Z výsledkov usudzujeme, že podávanie CuSO_4 morčiatm nenarušilo priebeh krivky B lymfocytov príznačnej pri priebehu endogénnej migrácie lariev u paratenických hostiteľov (Douwres a Tromba, 1971). I keď dávka 3 000 vajíčok *A. suum* pre morča je dostatočne efektívny antigénny stimul, reakcia tejto bunkovej populácie po exponovaní CuSO_4 a infikovaní bola však výrazne slabšia, v porovnaní s len infikovanými zvieratami.

Na detekciu obidvoch druhov imunokompetentných buniek sme použili rozetové metódy, ktoré stanovujú nižšie počty T a B lymfocytov ako sú ich skutočné hodnoty. Predpokladáme preto, že v experimentoch nemuselo dôjsť len k ich absolútnemu nárastu, ale aj k ovplyvneniu intenzity expresie CD2 receptorov, resp. iných faktorov, ktoré priaznivo ovplyvnili metodické podmienky a zvýšili adhérenciu krviniek na lymfocyty.

Po dobu expozície zvierat Cu nedošlo k ovplyvneniu hladiny komplementu. Po infikovaní morčiat sa v prvom rade zvýšila hladina AH^{50} . Táto sa zvyšuje obvykle okamžite po antigénnej stimulácii. Nárast aktivity CH^{50} sa prejavil neskôr – zrejme po väzbe antigénov *A. suum* so vzniknutými protilátkami. Mierny prechodný útlm hladiny komplementu u zvierat len infikovaných možno vysvetliť relatívne vysokou infekčnou dávkou vajíčok *A. suum* a tým neúmernou záťažou tejto zložky imunity v prvej fáze infekcie. Nárast hodnôt komplementu v ďalšom priebehu migrácie lariev *A. suum* je významný z hľadiska efektorovej funkcie tohto imunologického parametra okrem askariózy aj pri iných helmintózach, kde sa pôvodca dostáva do úzkeho kontaktu s tkanivom hostiteľa (Gerasimova, 1991).

Po exponovaní zvierat CuSO_4 a infikovaní sme zaznamenali rýchly nástup špecifických cirkulujúcich protilátok, čo mohlo byť dôsledkom známeho adjuvantného účinku Cu na antigény a tým zvýšenia ich efektívnosti (Bruin, 1980). Výraznejšie ovplyvnenie hladiny protilátok intoxikáciou sme nezistili. Nález nižšieho počtu lariev u medú zaťažených morčiat mohol však súvisieť aj s aktiváciou iných zložiek imunity (napr. fagocytov), ktoré sme v danej práci neskúmali.

Med, podobne ako iné ťažké kovy (ortuť, kadmium), má priamy negatívny účinok na patogenitu, virulenciu ako aj na fyziologické funkcie iných helmintov (Jana a Ghosh, 1987; Evans, 1982). Predpokladáme, že aj tento nepriaznivý vplyv Cu priamo na pôvodcu našej modelovej helmintózy sa pravdepodobne mohol podieľať (okrem stimulácie prevažnej väčšiny sledovaných imunologických parametrov) na pomerne výraznom znížení priemernej intenzity infekcie *A. suum*.

Z našich predchádzajúcich pokusov (Borošková a i., 1993) vyplýva, že subchronická intoxikácia morčiat priemyselnou imisiou s dominanciou medi a ortuti, pri tej istej modelovej helmintóze, výrazne redukovala

zastúpenie T a B bunkovej populácie, fagocytárnej aktivity makrofágov a v menšej miere potlačila aj aktivitu komplexu. Priemerná intenzita infekcie *A. suum* sa pritom zvýšila u morčiat o 15 %. Podobný inhibičný vplyv na imunitu sme zaznamenali aj po experimentálnej intoxikácii HgCl₂, čo sa tiež prejavilo zvýšením intenzity infekcie *A. suum* u morčiat (Borošková a i., 1995). Na rozdiel od uvedených poznatkov CuSO₄ v dávke, ktorá korelovala s obsahom Cu v priemyselnej imisii, nealterovala sledované imunologické parametre, ale mala u väčšiny z nich imunostimulačný účinok.

Keďže skúmaný ťažký kov je častou zložkou priemyselných imisii, bude významné preskúmať jeho účinok na imunitné prejavy a infekciu zvierat, a to v súvislosti s jeho známymi interakčnými vzťahmi s inými prvkami (As, Fe, Hg, Pb, Se, Zn) v prašných spádoch.

PodĎakovanie

Autori ďakujú Slovenskej grantovej agentúre pre vedu (Grant č. 2/95 a č. 95/5305/589) za čiastočné financovanie tejto práce.

LITERATÚRA

BENCKO, V. – CIKRT, M. – LENER, J.: Toxické kovy v pracovnom prostredí človeka. Praha, Avicenum 1991: 157–169.

BĚŘEŠ, J.: Interakčné vzťahy medi, železa, zinku, arzénu, kadmia a olova v pečeni oviec pri experimentálnej intoxikácii oxidom meďnatým. Vet. Med. (Praha), 34, 1989: 665–674.

BOROŠKOVÁ, Z. – BENKOVÁ, M. – ŠOLTÝS, J. – KRUPICER, I. – ŠIMO, K.: Effect of heavy metal imission on the cellular immunity of guinea pigs with experimental ascariasis. Vet. Parasit., 47, 1993: 245–254.

BOROŠKOVÁ, Z. – ŠOLTÝS, J. – BENKOVÁ, M.: Effect of mercury on the immune response and mean intensity of parasitic infection in guinea pigs. J. Helminth., 1995 (akceptované v tlači).

BREMMER, K. C. – KEITH, R. K.: The effect of copper deficiency on trichostrongylosis in dairy calves. Aust. Vet. J., 35, 1959: 389–395.

BRUIN, A. D.: Biochemical toxicology of environmental agents. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press 1980: 1436–1438.

CABADAJ, R. – GDOVIN, T.: Tolerancia síranu meďnatého (CuSO₄ · 5H₂O) u oviec. Vet. Med. (Praha), 15, 1970: 21–29.

DOUWRES, F. – TROMBA, F. G.: Comparative development of *Ascaris suum* in rabbits, guinea pigs, mice and swine in 11 days. Proc. Helminth. Soc. (Wash.), 38, 1971: 246–252.

EVANS, N. S.: Effect of copper and zinc upon the survival and infectivity of *Echinoparyphium recurvatum* cercariae. Parasitology, 85, 1982: 295–303.

GERASIMOVA, N. G.: Roľ komplementa vo vzájomnotožených chozjain a i. gefminta. In: Gefminty životných. Tr. Gelan, Tom 38, Akademija Nauk ZSSR, Izd. Nauka Moskva, 1991: 14–21.

HUCKERS, R. D. – YONG, W. K.: Effects of concurrent copper deficiency and gastro-intestinal nematodiasis on circulating copper and protein levels, liver copper and body-weight in sheep. Vet. Parasit., 19, 1986: 67–76.

ILUSSEIN, S. M. K. – JONES, B. E. W. – FRANF, A.: Selenium copper interaction in goats. Zbl. Veter. Med., R. A., 32, 1985: 321–330.

JANA, J. – GHOSH, K.: Effect of heavy metals on population growth of a fish nematode *Spincicuda spincicauda* in aquatic environment. Envir. Ecol., 5, 1987: 811–813.

JONES, W. O. – SYMONS, L. E. A.: The effect of copper deficiency on leucocyte function in sheep and cattle. Res. Vet. Sci., 37, 1982: 151–156.

LOCHMAN, I.: A simple method for detection of hemolytic activity of the complement. Českoslov. Epidemiol., 32, 1983: 103–110.

LUKASEWYTZ, O. A. – POHANKA, J. R.: Dietary copper deficiency suppresses the immune response of C58 mice. In: Federation Proceedings of 65th Annual Meeting, Atlanta, Georgia, April 12–17, 1981: 918.

MANČAL, J.: Metody imunoenzymové analýzy. Praha, ÚSOL 1986: 12–23.

MANUAL OF VETERINARY PARASITOLOGICAL LABORATORY TECHNIQUES. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Her Majesty's Stationary Office, 1986: 24.

PHILIPS, D. R. – CHAPPELL, R. J. – HAYES, J.: A possible role of Cu²⁺ ions in bovine antibody-antigen interaction. Res. Vet. Sci., 32, 1982: 221–224.

SOULSBY, E. J. L.: Immunology, immunopathology and immunoprophylaxis of *Ascaris* spp. In: SOULSBY, E. J. L. (ed.): Immune responses in parasitic infections. Vol. 1., Florida, CRC Press Inc. Boca Raton 1987: 127–140.

STARŠIA, A. – ŠTEFANOVIČ, J.: Stanovenie hladiny komplementu v krvnom sére. Imunol. Zprav., 8, 1977: 47–52.

WINCHESTER, R. J. – ROSS, G. D.: Enumerating cell population. In: ROSSE, N. R. – FRIEDMAN, H. – FAHEY, J. L. (eds.): Manual of Clinical Laboratory Immunology. Washington D. C., American Society for Microbiology 1987: 221–223.

WAGNER, W. – WAGNEROVÁ, M.: Ekoimmunologie. Praha, Avicenum 1988: 122–143.

YONG, W. K. – EDWARDS, L. D. – HUCKER, D. A.: Peripheral blood with cell responses during concurrent copper deficiency and gastro-intestinal nematodiasis in sheep. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 63, 1985: 273–281.

Došlo 21. 6. 1995

Kontaktná adresa:

MVDr. Zora Borošková, CSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/344 55, 353 69, fax 095/633 14 14

IDENTIFICATION OF AEROBIC AND FACULTATIVELY ANAEROBIC SPORULATING BACTERIA ISOLATED FROM OPERATIONS OF MILK PRIMARY PRODUCTION

IDENTIFIKACE AEROBNÍCH A FAKULTATIVNĚ ANAEROBNÍCH SPORULUJÍCÍCH BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z PRVOVÝROBY MLÉKA

Z. Páčová¹, J. Vyhnálková², J. Lukášová², J. Holec²

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

² Veterinary and Pharmaceutical University, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Aerobic and/or facultatively anaerobic sporulating Gram-positive bacteria of the genus *Bacillus* influence nutritive and sensory properties of pasteurized milk by their proteolytic and lipolytic activity. Since particularly raw milk is a source of pasteurized milk contamination by spore-producing bacteria, our investigations were focused on identification of bacilli from operations of milk agricultural primary production. The species *B. licheniformis* and *B. cereus* (Crielly et al., 1994) are the most frequently isolated ones in the process of milk production. While *B. licheniformis* as well as *B. subtilis* and *B. pumilus* are mesophilic species, *B. cereus* is rather psychrotrophic, and as to their health impacts they cause diseases from foods (Griffiths, 1990; Christiansson, 1992; Becker et al., 1994). Sixty-six strains were isolated and identified from operations of milk agricultural primary production (Tab. I). *B. licheniformis* occurrence (58 strains) was most frequent in the set of samples, followed by *B. subtilis* (5 strains), *B. pumilus* (one strain) and *B. cereus* (one strain), i.e. these are species classified to morphological group I (oval, cell-nonswelling spores). Only one strain *Paenibacillus amylolyticus* (formerly *Bacillus amylolyticus*) was isolated from morphological group II (oval, cell-swelling spores). Species representation of isolated strains is in agreement with literary data (Phillips and Griffiths, 1986; Sutherland and Murdock, 1994; Crielly et al., 1994). Our results did not confirm the seasonal occurrence (winter – summer) of mesophilic and psychrotrophic bacilli species as reported in literature (McKinnon and Pettipher, 1983; Sutherland and Murdock, 1994; Crielly et al., 1994). Biochemical and physiological characteristics of 66 isolates (Tab. I) are in agreement with literary data (Gordon et al., 1973; Parry et al., 1983; Priest et al., 1988; Ash et al., 1993). Strong proteolytic, amylolytic or lipolytic activities of the tested strains could influence the nutritive value of milk as a raw material. Taking into account the dominant representation of bacilli of morphological group I in raw and pasteurized milk (Sutherland and Murdock, 1994; Crielly et al., 1994) their review with basic phenotypic characteristics is shown in Tab. II. As follows from our results, mesophilic species from so called „*B. subtilis* group“ (96.9%) were isolated from agricultural primary production of milk most frequently. This is the reason why in addition to *B. cereus* it is also necessary to identify these species: seven tests shown in Tab. III are recommended for their rapid differentiation.

Gram-positive sporulating bacteria; mesophilic and psychrotrophic bacilli; seasonal occurrence; identification; raw and pasteurized milk

ABSTRAKT: Bylo identifikováno 66 kmenů sporulujících aerobních a fakultativně anaerobních bakterií, izolovaných ze zemědělské prvovýroby mléka. 65 kmenů bylo zařazeno do I. morfologické skupiny a identifikováno jako *Bacillus licheniformis* (58 kmenů), *B. subtilis* (5 kmenů), *B. pumilus* (1 kmen). Do II. morfologické skupiny byl zařazen jeden kmen a identifikován jako *Paenibacillus amylolyticus*. Nebyly zjištěny změny v druhovém zastoupení mesofilních bacilů vzhledem k sezónnímu odběru vzorků (leden, červen).

grampozitivní sporulující bakterie; mezofilní a psychrotrofní bacily; sezonnost výskytu; identifikace; syrové a pasterované mléko

ÚVOD

Aerobní, popř. fakultativně anaerobní sporulující grampozitivní bakterie rodu *Bacillus* ovlivňují svou proteolytickou a lipolytickou aktivitou nutriční a senzo-

rické vlastnosti pasterovaného mléka. Zdrojem kontaminace pasterovaného mléka sporotvornými bakteriemi je především syrové mléko, počet aerobních sporulujících bakterií se v průběhu technologického procesu při výrobě mléka již výrazně nemění. Proto výběr kvalitní

suroviny, technologie a dodržování správné hygieny při jeho zpracování zásadně ovlivňují kvalitu pasterovaného mléka.

Nejčastěji izolovanými druhy rodu *Bacillus* při procesu výroby mléka jsou druhy *B. licheniformis* a *B. cereus* (Crielly aj., 1994). Zatímco *B. licheniformis* patří spolu s *B. subtilis* a *B. pumilus* k převládajícím mezofilním druhům, *B. cereus* je spíše psychrotrofní druh, který se může množit v mléčných výrobcích i při chladničkové teplotě a způsobovat onemocnění z potravin (Holmes aj., 1981; Christiansson aj., 1989; Griffiths, 1990; Christiansson, 1992). Schopnost tvořit endospory, které jsou vysoce rezistentní k vyšším teplotám, sušení apod., vede k přežívání bacilů po pasterizaci mléka, a proto jsou především tyto druhy kontaminanty dětské výživy, založené na bázi sušeného mléka (Singh aj., 1980; Anderton, 1986; Becker aj., 1994).

Vzhledem ke zdravotnímu riziku výše uvedených druhů bacilů a jejich vlivu na kvalitu pasterovaného mléka, zaměřili jsme se na zjištění druhového spektra bacilů izolovaných ze zemědělské prvovýroby mléka jako možného zdroje kontaminace mléka a mléčných výrobků.

MATERIÁL A METODY

V práci bylo testováno 66 kmenů bacilů izolovaných v zimním (kmeny 1–17) a letním období (18–66) v roce 1992 ve školním zemědělském podniku Nový Dvůr. Zdrojem izolace bylo syrové mléko před a po ukončení dojení a dále stěry z vemene a kůže dojníc, faeces, sláma a krmná siláž. Izolace kmenů byla provedena na masopeptonovém agaru při teplotě 30 °C po předchozí devitalizaci vzorků při teplotě 85 °C po 10 minutách.

Morfologická charakteristika

Produkce spor byla zjišťována po dobu kultivace 1–7 dnů při teplotě 30 °C na masopeptonovém agaru s 10,0 mg MnSO₄·H₂O/l.

Biochemická a fyziologická charakteristika

Fenotypické vlastnosti byly testovány konvenčními růstovými testy (Gordon aj., 1973), arginin dihydroláza (Brooks a Sodeman, 1974), ONPG (Low, 1962), produkce fosfatázy (Páčová a Kocur, 1978). Z komerčních testů byly použity: Simmons' citrát (Oxoid, CM155), *B. cereus* agar (HiMedia M833) pro egg-yolk reakci, médium pro anaerobní růst (BBL No. 10926).

VÝSLEDKY

Biochemická a fyziologická charakteristika 66 izolovaných kmenů je uvedena v tab. I. Nejčastěji se v sou-

boru vzorků z prvovýroby mléka vyskytoval druh *B. licheniformis* (58 kmenů), dále *B. subtilis* (5 kmenů), *B. pumilus* (1 kmen) a *B. cereus* (1 kmen). Tyto druhy patří do I. morfologické skupiny rodu *Bacillus*, tzn., že tvoří oválné spory nezduřující buňku. Pouze jeden kmen patřil do II. morfologické skupiny (oválné spory zduřující buňku) a byl identifikován jako *Paenibacillus amylolyticus*. Všechny identifikované kmeny byly kataláza pozitivní, 60 kmenů bylo fakultativně anaerobních. Proteolytická a amylolytická aktivita kmenů byla rovněž velmi vysoká, 65 kmenů hydrolyzovalo želatinu, kazein a škrob. Lecitinázou produkoval pouze jeden kmen *B. cereus*. Voges-Proskauer test a Simmons' citrát byl pozitivní u všech 66 kmenů I. morfologické skupiny. Oba tyto testy byly naopak negativní u *Paenibacillus amylolyticus*. Nitráty redukovalo 65 kmenů, negativní byl jeden kmen *B. pumilus*. Kyselínu z glukózy produkovaly všechny testované kmeny, z manitolu a xylózy 65 kmenů. Negativní měl tyto dva cukry druh *B. cereus*. V 7% NaCl rostly všechny kmeny I. morfologické skupiny, při teplotě 55 °C rostly pouze kmeny druhu *B. licheniformis*.

DISKUSE

Vzhledem k tomu, že k nutričním i senzorickým změnám pasterovaného mléka přispívají i druhy rodu *Bacillus*, jejichž prvotním zdrojem může být i syrové mléko, zaměřili jsme se na identifikaci 66 izolátů bacilů ze zemědělské prvovýroby mléka. Identifikované kmeny tvořily homogenní skupinu mezofilních druhů, která je někdy označována jako „*B. subtilis* skupina“. Patří sem druhy *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* a *B. amylolyticus*. Izolace mezofilních druhů ze syrového mléka odpovídá literárním údajům (Martin, 1981; Cousins a Bramley, 1981; Phillips a Griffiths, 1986; Sutherland a Murdock, 1994). Zatímco Sutherland a Murdock (1994) uvádějí přibližně stejné množství izolovaných kmenů u druhů *B. pumilus*, *B. licheniformis* a *B. subtilis*, Phillips a Griffiths (1986) a Crielly aj. (1994) uvádějí nejfrekventovanější výskyt druhu *B. licheniformis*, což je v souladu s našimi údaji (tab. I).

Z psychotrofních druhů jsou izolovány především druhy *B. cereus*, *B. mycoides* a *B. circulans* (Phillips a Griffiths, 1986; Griffiths a Phillips, 1990; van Heddeghem a Vlaemynck, 1992; Sutherland a Murdock, 1994; Crielly aj., 1994). Dle literárních údajů převážná část kmenů *B. cereus* izolovaných z pasterovaného mléka nepochází však ze zemědělské prvovýroby mléka. Zatímco většina autorů poukazuje na sezonnost výskytu mezofilních a psychotrofních bacilů v syrovém a pasterovaném mléce (Ridway, 1954; McKinnon a Pettipher, 1983; Sutherland a Murdock, 1994; Crielly aj., 1994), naše výsledky jsou

Testy – Tests	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
	(58 kmenů – strains)	(5 kmenů – strains)	(1 kmen – strain)	(1 kmen – strain)	(1 kmen – strain)*
Anaerobní růst – anaerobic growth	+	–	–	+	+
Egg-yolk reakce – egg-yolk reaction	–	–	–	+	–
Voges-Proskauer test – Voges-Proskauer test	+	+	+	+	–
Simmons' citrát – Simmons citrate	+	+	+	+	–
Redukce nitrátů – nitrate reduction	+	+	–	+	+
Arginin dihydroláza – arginine dihydrolase	+	–	–	–	–
Tvorba indolu – indole production	–	–	–	–	–
Kataláza – catalase	+	+	+	+	+
Fosfatáza – phosphatase	+	–	–	+	–
Ureáza – urease	–**	–	–	–	–
Hemolýza – hemolysis	–	–***	+	+	–
Hydrolyzáza – hydrolysis of					
kazeinu – casein	+	+	+	+	–
želatiny – gelatin	+	+	+	+	–
škrobu – starch	+	+	–	+	+
Produkce kyseliny z – acid production from					
glukózy – glucose	+	+	+	+	+
manitolu – mannitol	+	+	+	–	+
xylózy – xylose	+	+	+	–	+
Růst – growth					
při 55 °C – at 55 °C	+	–	–	–	–
v 7% NaCl – in 7% NaCl	+	+	+	+	–

Vysvětlivky – Explanatory notes:

+ = pozitivní – positive; – = negativní – negative

* = pozitivní laktóza, hydrolyzáza eskulinu a ONPG, neroste při 50 °C, netvoří „pohyblivé“ mikrokolonie – positive lactose, esculin hydrolysis and ONPG, no growth at 50 °C, no formation of „moving“ colonies; ** = tři kmeny pozitivní – three positive strains; *** = jeden kmen pozitivní – one positive strain

spíše v souladu s autory Muir aj. (1978) a Phillips a Griffiths (1986), kteří uvádějí pouze nepatrné změny v celkovém počtu mezofilních bacilů v syrovém mléce v závislosti na ročním období. Na antagonistický efekt druhů *B. licheniformis* a *B. subtilis* na psychrotrofní izoláty *B. cereus* a *B. pumilus* upozorňují Sutherland a Murdock (1994). Tím si lze snad i částečně vysvětlit velmi nízký počet námi izolovaných kmenů *B. cereus* a *B. pumilus* (tab. I).

Z literárních údajů vyplývá (Sutherland a Murdock, 1994), že nejčastěji izolovanými druhy II. morfologické skupiny jsou především *B. pantothenicus*, *B. stearothermophilus* a *B. circulans*. Z celkového počtu izolovaných kmenů však zástupci této morfologické skupiny tvořili pouze 5,7 %. Ternström aj. (1993) uvádějí velmi častou izolaci druhu *B. polymyxa*, avšak pouze z pasterovaného mléka. Vzhledem k izolačnímu režimu (30 °C) jsme nemohli zachytit striktně termofilní kmeny druhu *B. stearothermophilus*, které při této teplotě nerostou. Kmen identifikovaný jako *Paenibacillus amylolyticus* (dříve *B. amylolyticus*, II. mor-

fologická skupina) patří spolu s *B. lautus*, *B. pabuli* a *B. validus* (Nakamura, 1984) k druhům, které byly dříve určovány jako *B. circulans*. Ash aj. (1993), přeřadil tyto druhy do nového rodu *Paenibacillus*, zatímco *B. circulans* (*sensu stricto*) zůstává v rodě *Bacillus*.

Biochemická a fyziologická charakteristika 66 izolátů, uvedená v tab. I je v souladu s literárními údaji (Gordon aj., 1973; Parry aj., 1983; Nakamura, 1984; Priest aj., 1988; Ash aj., 1993). Jelikož se dle literárních údajů (Sutherland a Murdock, 1994; Crielly aj., 1994) v syrovém mléce vyskytují především bacily I. morfologické skupiny, je v tab. II uveden jejich přehled se základními fenotypickými znaky (Gordon aj., 1973; Parry aj., 1983; Nakamura, 1987; Priest aj., 1988). Jak vyplývá z našich výsledků, nejčastěji byly ze zemědělské provovýroby mléka izolovány mezofilní druhy „*B. subtilis* skupiny“ (96,9 %), proto je nutné jejich identifikaci, vedle *B. cereus*, věnovat náležitou pozornost. K rychlé diferenciaci těchto druhů ve veterinární praxi doporučujeme sedm testů uvedených v tab. III.

II. Biochemická a fyziologická charakteristika druhů rodu *Bacillus* vyskytujících se v mléce a mléčných výrobcích (I. morfologická skupina) – Biochemical and physiological characteristics of species of the genus *Bacillus* occurring in milk and dairy products (Morphological group I)

Testy – Tests	<i>B. cereus</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. lentus</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. smithii</i>
Egg-yolk reakce – egg-yolk reaction	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhizoidní kolonie – rhizoid colonies	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anaerobní růst – anaerobic growth	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Simmons' citrát – Simmons' citrate	+	+	+	+	+	+	+	-	-	d	d
Voges-Proskauer test – Voges-Proskauer test	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
Redukce nitrátů – nitrate reduction	+	+	d	+	+	+	-	+	d	d	-
Hydrolyzá – hydrolysis of											
kazeinu – casein	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
želatiny – gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
Tweenu 80 – Tween 80	d	d	d	+	+	-	+	+	+	-	NT
škrobu – starch	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	d
eskulinu – esculin	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	d
Fosfatáza – phosphatase	+	d	-	+	d	+	-	-	-	d	NT
Hemolýza – hemolysis	+	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Ureáza – urease	d	d	d	d	d	-	-	-	-	-	-
Arginin dihydroláza – arginine dihydrolase	d	d	-	+	-	NT	-	-	-	-	-
Růst – growth											
v 7% NaCl – in 7% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
při 50 °C – at 50 °C	-	-	-	+	d	+	d	-	-	+	+
při 55 °C – at 55 °C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Kyselina z – acid production from											
glukózy – glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
manitolu – mannitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	d	d
xylózy – xylose	-	-	+	+	+	-	+	-	d	d	d
laktózy – lactose	-	-	d	d	-	+	d	-	-	+	-

Vysvětlivky pro tab. II a III – Explanatory notes to Tabs. II and III:

+ = pozitivní reakce – positive reaction; - = negativní reakce – negative reaction; d = variabilní reakce – variable reaction; NT = netestováno – not tested

III. Rychlá diferenciaci druhů *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* a *B. pumilus* – Rapid differentiation of the species *B. licheniformis*, *B. subtilis* and *B. pumilus*

Testy – Tests	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. pumilus</i>
Anaerobní růst – anaerobic growth	+	-	-	-
Růst při 55 °C – growth at 55 °C	+	-	-	-
Arginin dihydroláza – arginine dihydrolase	+	-	NT	-
Redukce nitrátů – nitrate reduction	+	+	+	-
Fosfatáza – phosphatase	+	d	+	-
Produkce kyseliny z – acid production from				
xylózy – xylose	+	+	-	+
laktózy – lactose	d	-	+	d

LITERATURA

- ANDERTON, A.: Microbiological quality of products used in enteral feeds. *J. Hospital Infect.*, 7, 1986: 68–73.
- ASH, C. – PRIEST, F. G. – COLLINS, M. D.: Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64, 1993: 253–260.
- BECKER, H. – SCHALLER, G. – von WIESE, W. – TERPLAN, G.: *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 1994: 1–15.
- BROOKS, K. – SODEMAN, T.: A rapid method for determining decarboxylase and dihydrolase activity. *J. Clin. Pathol.*, 27, 1974: 148–152.
- COUSINS, C. M. – BRAMLEY, A. J.: The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. (ed.): *Dairy Microbiology* Vol. 1. Applied Science Publishers, London, 1981: 119–163.
- CRIELLY, E. M. – LOGAN, N. A. – ANDERTON, A.: Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 1994: 256–263.
- GORDON, R. E. – HAYNES, W. C. – PANG, C. H. N.: The genus *Bacillus*. *Agriculture Handbook No. 427*. United States Department of Agriculture, Washington, D.C., 1973.
- GRIFFITHS, M. W.: Toxin production of psychrotrophic *Bacillus* species present in milk. *J. Food Protect.*, 53, 1990: 790–792.
- GRIFFITHS, M. W. – PHILLIPS, J. D.: Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* spp. found in raw and pasteurized milk. *J. Soc. Dairy Technol.*, 43, 1990: 62–66.
- HEDDEGHEM, A. – VLAEMYNCK, G.: Sources of contamination of milk with *B. cereus* on the farm and in the factory. *Bull. Int. Dairy Fed.*, 275, 1992: 19–22.
- HOLMES, J. R. – PLUNKETT, T. – PATE, P. – ROPER, W.-L. – ALEXANDER, W. J.: Emetic food poisoning caused by *Bacillus cereus*. *Arch. Int. Med.*, 141, 1981: 766–767.
- CHRISTIANSSON, A.: The toxicology of *Bacillus cereus*. *Bull. Int. Dairy Fed.*, 275, 1992: 30–35.
- CHRISTIANSSON, A. – NAIDU, A. S. – NILSSON, I. – WADSTROM, I. – PETTERSSON, H. E.: Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1989: 2595–2600.
- LOWE, G. H.: The rapid detection of lactose fermentation in paracolon organisms by the demonstration of β -galactosidase. *J. Med. Lab. Technol.*, 19, 1962: 21.
- MARTIN, J. H.: Heat resistant mesophilic microorganisms. *J. Dairy Sci.*, 64, 1981: 149–156.
- McKINNON, C. H. – PETTIPHER, G. L.: A survey of sources of heat resistant bacteria in milk with particular reference to psychrotrophic spore-forming bacteria. *J. Dairy Res.*, 50, 1983: 163–170.
- MUIR, D. D. – KELLY, M. E. – PHILLIPS, J. D. – WILSON, A. G.: The quality of blended raw milk in creameries in South West Scotland. *J. Sci. Dairy Technol.*, 31, 1978: 137–144.
- NAKAMURA, L. K.: *Bacillus amyolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus pabuli* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 1984: 224–226.
- NAKAMURA, L. K.: Deoxyribonucleic acid relatedness of lactose-positive *Bacillus subtilis* strains and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 1987: 444–445.
- PÁČOVÁ, Z. – KOCUR, M.: Phosphatase activity among aerobic and anaerobic bacteria. *Zentbl. Bakt. Parasit-Kde, I. Abt. Orig. A.*, 241, 1978: 481–487.
- PARRY, J. M. – TURNBULL, P. C. D. – GIBSON, J. R.: A colour atlas of *Bacillus* species. Wolfe Medical Publications Ltd. 1983.
- PHILLIPS, J. D. – GRIFFITHS, M. W.: Factors contributing to the seasonal variation of *Bacillus* spp. in pasteurized dairy products. *J. Appl. Bacteriol.*, 61, 1986: 275–285.
- PRIEST, F. G. – GOODFELLOW, M. – TODD, C.: A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1988: 1847–1882.
- RIDGWAY, D. B.: A note on the seasonal variation of the keeping quality of commercial sterilized milk. *J. Appl. Bacteriol.*, 17, 1954: 1–5.
- SINGH, R. S. – SINGH, S. – BATISH, V. K. – RANGA-NATHAN, B.: Bacteriological quality of infant milk foods. *J. Food Protect.*, 43, 1980: 340–342.
- SUTHERLAND, A. D. – MURDOCK, R.: Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. *Int. J. Food Microbiol.*, 21, 1994: 279–292.
- TERNSTRÖM, A. – LINDBERG, A. M. – MOLIN, G.: Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 1993: 25–34.

Došlo 3.8.1995

Kontaktní adresa:

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

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

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

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

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

EFFECTS OF ACIDIFICATION ON *SALMONELLA ENTERITIDIS* IN A DEFINED MEDIUM

VLIV OKYSELOVÁNÍ NA *SALMONELLA ENTERITIDIS* V DEFINOVANÉM MĚDIU

V. Růžičková

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Effects of five acids on three highly virulent strains of *Salmonella enteritidis* in a defined medium were investigated at various inoculum sizes. The following minimal inhibition concentrations (MIC) were found for the acids: citric and tartaric – 0.2%, pH 4.0 and 3.8, respectively; acetic and propionic – 0.1%, pH 4.5 and 4.6, respectively; hydrochloric – 0.05%, pH 3.6. Bactericidal effect was evident in the organic acids at the concentration 0.4% within the pH range 3.3–3.9, and in the hydrochloric acid at the concentration 0.025%, pH 2.5 (Fig. 2, Tab. I). As to the intensity of inhibition at MIC for *Salmonella* suspensions with cell densities 7 to 8 logs per ml, the acids were arranged into the following ascending order: citric < tartaric < propionic < acetic < hydrochloric. The respective order for the cell densities 6 to 7 log per ml was: propionic < tartaric < hydrochloric < citric < acetic. The mean difference between the initial and the final count of salmonellae was –1.3 to –1.8 log and –2.5 to –4.6 log for the weakest and the strongest acids, respectively (Tab. II). Differences not only between the acids, but also between the strains, depending on inoculum sizes, were found at the nearest-to-MIC lower concentrations (subMIC). The weakest effects at subMIC were found in propionic (0.05%; pH 5.0) and citric (0.1%; pH 4.5) acids. Tartaric acid (0.1%; pH 4.5) did not stop the growth of salmonellae at cell densities 1.7 to 2.6 log per ml, but, unlike the former two, inhibited strain II (food isolate) and strain III (egg isolate) at cell densities 0.5 and 0.6 log per ml, respectively. The strains survived the acidification with acetic acid at cell densities 4.6 to 4.9 log per ml, but the densities decreased by 1.3 to 1.7 log. Hydrochloric acid (0.025%; pH 4.6) inhibited strains II and III already at 2.3 to 3.0 log per ml, whereas strain I (human carrier isolate) was relatively acidfast even at 1.7 log per ml. Limiting factors in the acid inhibition of salmonellae include not only the type, concentration and dissociation rate of the acid, but also the amount of the exposed *Salmonella* cells.

Salmonella enteritidis; minimal inhibition concentration; acetic, citric, hydrochloric, propionic and tartaric acids

ABSTRAKT: Byly sledovány účinky pěti vybraných kyselin na tři vysoce virulentní kmeny *Salmonella enteritidis* v definovaném laboratorním médiu ve vztahu k velikosti inokula. Konvenční zkumavkovou metodou byly pro salmonely stanoveny následující minimální inhibiční koncentrace (MIK) kyselin: citronová a vinná 0,2 % (pH 4,0 a 3,8), octová a propionová 0,1 % (pH 4,5 a 4,6) a chlorovodíková 0,05 % (pH 3,6). Baktericidní účinek vykazaly organické kyseliny v koncentraci 0,4 % a v rozpětí pH od 3,3 do 3,9 a konečně 0,025 % kyselina chlorovodíková s pH 2,5. Pokud se týká intenzity inhibice v MIK, kyseliny působily na salmonely v počtu 7 až 8 řádů v následujícím vzestupném pořadí: citronová < vinná < propionová < octová < chlorovodíková. Kultury salmonel v počtu 6 až 7 řádů byly inhibovány kyselinami v následujícím vzestupném pořadí: propionová < vinná < chlorovodíková < citronová < octová. V nejbližší nižší koncentraci k MIK, tj. v subMIK, měly nejslabší účinky kyseliny propionová (0,05 %; pH 5,0) a citronová (0,1 %; pH 4,6). Kyselina vinná (0,1 %; pH 4,5) nezastavila růst salmonel v počtech 1,7 až 2,6 řádu. Kyselina chlorovodíková (0,025 %; pH 4,6) inhibovala kmeny II a III již v počtech 2,3 až 3,0 řádu, zatímco kmen I (izolát z pacienta) vykazoval relativní acidorezistenci k této kyselině ještě v hustotě buněk 1,7 řádu. Nejúčinnější v subMIK byla kyselina octová. Její působení přežily kmeny s počtem 4,6 až 4,9 řádu, avšak se ztrátou 1,3 až 1,7 řádu. Z hlediska prevence salmonelóze je významné zjištění, že limitujícími faktory v okyselování salmonel jsou nejenom druh kyseliny, její koncentrace a stupeň disociace, ale i množství exponovaných buněk salmonel.

Salmonella enteritidis; minimální inhibiční koncentrace; kyselina citronová, octová, vinná, propionová a chlorovodíková

ÚVOD

Salmonelózy jsou v současné době nejnámější a nejčastější onemocnění lidí z potravin. Přibližně od roku 1985 vzrostl výskyt onemocnění vyvolaných sérovarem *Salmonella enteritidis* v České republice

a stejně i v zemích evropského, amerického a afrického kontinentu (Gerigk, 1992; Pegues a Miller, 1994; Šrámová a Beneš, 1994; Morse aj., 1994).

Vzhledem ke skutečnosti, že salmonelózy mohou vzniknout jen po požití potravin obsahující živé bak-

teriální buňky, technologie zpracování potravin a výroba hotových pokrmů používají postupy, které vedou k úplnému zničení salmonel. Mezi nejběžnější používanými procesy jsou tepelné opracování a okyselování (Matyáš, 1990, 1993; Rosický aj., 1994).

Salmonely jsou relativně citlivé na přítomnost kyselin a na dosažení určité hodnoty pH, které určuje stupeň jejich disociace. Literární prameny obecně uvádějí rozsah pH umožňující růst salmonel mezi 4,1 až 9,0 s optimem pH od 6,5 do 7,5 (např. El-Gazzar a Martrth, 1992; Matyáš, 1993). Antibakteriální účinky při okyselování pokrmů úzce souvisí s druhem použité kyseliny, jejími fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako je např. délka řetězce, rozpustnost, stupeň nasycení, lipofilie a s její výslednou koncentrací, při které se dosáhne limitní inhibiční hodnoty pH. Hlavně však závisí na koncentraci nedisociovaných molekul kyseliny, neboť nedisociované formy kyselin snáze pronikají dovnitř buňky a uvolněnými protony okyselují její obsah (Ingram aj., 1956; Hunter a Segel, 1973; Macris, 1975; El-Gazzar aj., 1987).

Cílem této práce bylo sledovat působení pěti vybraných kyselin na tři vysoce virulentní kmeny *S. enteritidis* a objasnit vztah mezi koncentrací kyselin a počtem exponovaných buněk v definovaném laboratorním médiu.

MATERIÁL A METODY

V pokusech byly použity následující kmeny *S. enteritidis*: kmen I (izolát z pacienta), kmen II (izolát z cukrářských výrobků, které zapříčinily salmonelózu), kmen III (izolát z vaječné blány; fagotyp 4).

K okyselování salmonel byly použity následující kyseliny (všechny p. a.): kyselina citronová, kyselina octová, kyselina vinná, kyselina propionová a kyselina chlorovodíková.

Pro stanovení minimální inhibiční (MIK) a baktericidní (MBK) koncentrace byla použita diluční zkumavková metoda podle Urbáškové aj. (1985). Koncentrační řada kyselin v rozpětí od 0,025 do 0,8 % byla připravena dvojnásobným ředěním zásobního 1,6% roztoku kyseliny v peptonové vodě (ČSN 56 0100). Po inokulaci a za 20 h při teplotě 37 °C byla stanovena jako minimální inhibiční koncentrace ta, při které zůstalo testační médium po inkubaci nezkaleno. Baktericidní účinek byl zjišťován zpětnou kultivací z testovacích zkumavek na agaru s fenolovou červení a brilantovou zelení (ČSN 56 0088).

Hodnoty pH roztoků kyselin v peptonové vodě byly měřeny na pH-metru Radiometer, Copenhagen. Tabeleované hodnoty pH jsou průměrné hodnoty ze tří měření.

Při sledování vlivu vybraných kyselin na tři kmeny *S. enteritidis* ve vztahu k počtu exponovaných buněk byly jednodenní kultury salmonel narostlé v masopeptonovém bujonu (základ č. 2; Imuna, Šarišské Michařany) desetinasobně ředěny ve fyziologickém roztoku tak, aby vznikla řada suspenzí s počtem buněk v rozmezí od

10^8 do 10^0 v 1 ml. Z každé suspenze bylo dvakrát odebrané inokulum po 0,1 ml. Jedna dávka inokula byla přidána do 1 ml roztoků kyselin v peptonové vodě o různé koncentraci a druhá dávka byla přidána do stejného objemu fyziologického roztoku, ve kterém se zjistil celkový počet buněk. Inkubace probíhala při teplotě 37 °C a trvala 20 hodin. Počty salmonel byly zjišťovány plotnovou metodou na agaru s fenolovou červení a brilantovou zelení dle ČSN 56 0088. Tabeleované výsledky jsou průměrné hodnoty ze tří stanovení. Statistické vyhodnocení a porovnání výsledků bylo provedeno metodou analýzy rozptylu jednoduchého třídění na PC pomocí programu STAT Plus verze 1.01 (Matoušková aj., 1992).

VÝSLEDKY

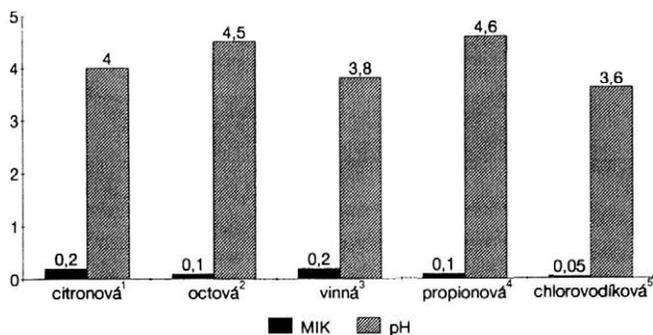
Dosažené výsledky minimálních inhibičních (MIK) a baktericidních (MBK) koncentrací kyseliny citronové, octové, vinné, propionové a chlorovodíkové a jejich pH v peptonové vodě jsou demonstrovány v obr. 1 a 2 a v tab. I. Bylo zjištěno, že organické kyseliny inhibovaly salmonely v koncentračním rozpětí MIK od 0,1 do 0,2 %, zatímco kyselina chlorovodíková působila inhibičně již při koncentraci 0,05 %. Salmonely nepřežily působení 0,4 % roztoků organických kyselin a 0,1% kyseliny chlorovodíkové v peptonové vodě (obr. 2).

Hodnoty pH naměřené u testovaných kyselin se navzájem lišily nejen podle koncentrace, ale hlavně podle toho, zda se jednalo o organickou nebo anorganickou kyselinu (tab. I). Inhibiční vliv kyselin charakterizovaný MIK se projevil v rozmezí hodnot pH 3,6 až 4,6. Žádný z kmenů *S. enteritidis* nepřežil okyselování v rozpětí hodnot pH od 2,5 do 3,5. Diference mezi bakteriostatickým a germicidním účinkem pH činila u organických kyselin 0,5 až 0,7, zatímco u kyseliny chlorovodíkové 1,1.

Chování tří kmenů *S. enteritidis* při působení kyselin citronové, octové, propionové, vinné a chlorovodíkové v MIK je demonstrováno počty přežívajících v tab. II. Při denzitě salmonel od 7,7 do 8,2 log řádu byl zaznamenán antibakteriální účinek kyselin (vyjádřený log počtu usmrcených bakterií) v následujícím vzestupném pořadí: citronová (-1,6 až -1,9), vinná (-1,8 až -2,1), propionová (-1,6 až -2,2), octová (-2,1 až -3,2) a chlorovodíková (-4,6 až -4,7).

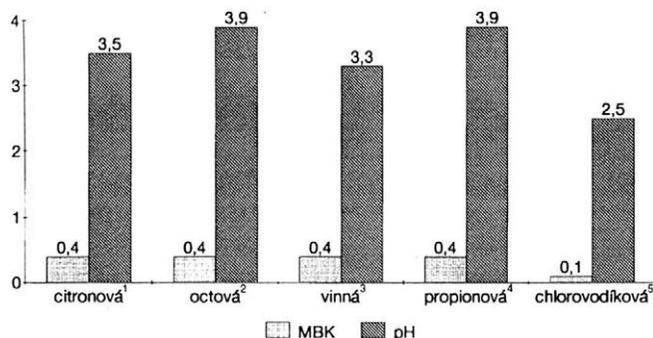
Inhibiční vliv kyselin na salmonely o denzitě od 6,6 do 7,0 řádu lze stejnými parametry vyjádřit vzestupně následovně: propionová (-0,7 až -2,3) vinná (-3,4 až -3,7) a chlorovodíková (-3,7 až -3,9), citronová (-3,7 až 3,9) a octová (-2,9 až -4,3).

Při denzitě salmonel od 5,6 do 5,9 řádu byl zaznamenán překvapivě nejnižší účinek u kyseliny chlorovodíkové, která zredukovala výchozí počet o 2,7 až 2,8 řádu. Následovala kyselina propionová s redukcí počtu salmonel o 4,1 až 4,7 řádu. Ostatní kyseliny, tj. citronová, octová a vinná měly na salmonely o stejné denzitě a za stejných podmínek letální účinky.



1. Minimální inhibiční koncentrace (MIK) v % a pH vybraných kyselin pro *S. enteritidis* – Minimal inhibition concentrations (MIK) in % and pH values of some acids for *S. enteritidis*

Pro obr. 1 a 2 – For Figs 1 and 2:
¹citric, ²acetic, ³tartaric, ⁴propionic, ⁵hydrochloric acid



2. Minimální baktericidní koncentrace (MBK) v % a pH vybraných kyselin pro *S. enteritidis* – Minimal bactericidal concentrations (MBK) in % and pH values of some acids for *S. enteritidis*

Mezi kmeny *S. enteritidis* nebyl statisticky prokázán rozdíl při působení kyselin v MIK. K nejsilnější organické kyselině octové byl relativně nejcitlivější kmen I (izolát od pacienta) a ke kyselině chlorovodíkové kmen III (izolát z vejce).

Výsledky působení všech pěti kyselin v nejbližší nižší koncentraci k MIK, tj. v tzv. subMIK ve vztahu k počtu exponovaných buněk salmonel, charakterizují údaje v tab. III. Bylo zjištěno, že všechny kyseliny v subMIK a v rozpětí pH od 4,5 do 5,0 neovlivnily růst a množení salmonel, jestliže bylo jejich výchozí množství 5, 6, 7 a 8 řádů v 1 ml.

Při výchozí denzitě okyselených salmonel nižší než 5 řádů nebyl po dobu 20 h při teplotě 37 °C patrný

zákal. Variabilita v účincích kyselin se projevila výrazněji až ve čtvrtém až sedmém ředění, tj. při výchozích počtech salmonel od 4,9 do 2,5 řádu. Všechny tři kmeny *S. enteritidis* snadno přežily působení 0,05% kyseliny propionové (pH 5,0) a 0,1% kyseliny citronové (pH 4,6) v množství buněk 0,5 a 1,3 log řádu. Při teplotě pro růst optimální reagovaly zvýšením výchozího počtu u kyseliny citronové o 1,5 až 2,1 řádu a u kyseliny propionové o 1,5 až 4,4 řádu.

Z tab. III vyplývá, že kmeny *S. enteritidis* se chovaly odlišně při působení kyseliny vinné a chlorovodíkové v subMIK, tj. v 0,1 a 0,025% koncentraci. V obou případech vykázal relativní odolnost vůči okyselení kmen I. Snadno přežil jednodenní expozici 0,1% kyseliny

I. Hodnoty pH kyselin v závislosti na koncentraci (%) – pH values of acids in dependence upon concentrations (%)

Kyselina ¹	Koncentrace ² (%)					
	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025
Citronová ²	3,1	3,5	4,0*	4,6	5,2	ND**
Octová ³	3,7	3,9	4,2	4,5*	5,0	ND**
Vinná ⁴	2,9	3,3	3,8*	4,5	5,3	6,5
Propionová ⁵	3,7	3,9	4,2	4,6*	5,0	6,3
Chlorovodíková ⁶	1,1	1,3	1,7	2,5	3,6*	4,6

* zvýrazněné hodnoty pH pro MIK jednotlivých kyselin – highlighted pH values for MIC of the particular acids

** nedetekováno – not detected

¹acid, ²citric, ³acetic, ⁴tartaric, ⁵propionic, ⁶hydrochloric, ⁷concentration

II. Vliv kyselin na *S. enteritidis* v minimální inhibiční koncentraci (%) ve vztahu k počtu buněk – The effect of acids on *S. enteritidis* at minimal inhibition concentration (%) in relation to cell counts

Kyselina (%)	Číslo ředění ⁷	Čas ⁸ (h)	Log počtu salmonel v 1 ml (diference) ⁹		
			Kmen I ¹⁰	Kmen II ¹¹	Kmen III ¹²
Citronová ² (0,2)	0	0	7,73	7,76	7,75
	0	24	5,93 (-1,80)	5,85 (-1,91)	6,15 (-1,60)
	1	0	6,67	6,64	6,69
	1	24	2,84 (-3,83)	2,94 (-3,70)	2,76 (-3,93)
	2	0	5,73	5,80	5,72
	2	24	0	0	0
Octová ³ (0,1)	0	0	8,18	8,23	8,04
	0	24	4,98 (-3,20)	5,91 (-2,32)	5,98 (-2,06)
	1	0	6,91	7,18	6,84
	1	24	2,81 (-4,1)	2,93 (-4,25)	3,91 (-2,93)
	2	0	5,93	5,83	5,75
	2	24	0	0	0
Vinná ⁴ (0,2)	0	0	7,73	7,81	7,96
	0	24	5,98 (-1,75)	6,00 (-1,81)	5,83 (-2,13)
	1	0	6,96	6,97	6,88
	1	24	3,28 (-3,68)	3,26 (-3,71)	3,46 (-3,42)
	2	0	5,89	5,86	5,87
	2	24	0	0	0
Propionová ⁵ (0,1)	0	0	8,15	7,72	7,83
	0	24	6,18 (-1,97)	6,15 (-1,57)	5,59 (-2,24)
	1	0	6,74	6,59	6,70
	1	24	4,46 (-2,28)	5,85 (-0,74)	5,71 (-0,99)
	2	0	5,69	5,81	5,78
	2	24	1,62 (-4,07)	1,32 (-4,49)	1,72 (-4,06)
	3	0	4,52	4,73	4,69
	3	24	1,08 (-3,44)	0,95 (-3,78)	1,04 (-3,65)
	4	0	3,63	3,83	3,73
	4	24	0,78 (-2,85)	0,70 (-3,13)	1,78 (-1,95)
	5	0	2,62	2,70	2,65
	5	24	0,0 (-2,62)	0,30 (-2,40)	0,48 (-2,17)
	6	0	1,78	1,83	1,83
	6	24	0	0	0
Chlorovodíková ⁶ (0,05)	0	0	7,97	8,00	8,04
	0	24	3,40 (-4,57)	3,43 (-4,57)	3,34 (-4,70)
	1	0	6,91	6,89	6,97
	1	24	3,18 (-3,73)	3,23 (-3,66)	3,09 (-3,88)
	2	0	5,62	5,75	5,67
	2	24	2,87 (-2,75)	2,96 (-2,79)	2,93 (-2,74)
	3	0	4,70	4,83	4,72
	3	24	0	0	0

For 1–6 see Tab. I; ⁷dilution no., ⁸time, ⁹log of salmonella counts in 1 ml (difference), ¹⁰strain I, ¹¹strain II, ¹²strain III

liny vinné (pH 4,5) a z výchozího počtu nižšího než jeden řád dosáhl denzity kultury šest řádů. Kmeny II a III při působení kyseliny vinné zvýšily výchozí počty buněk 1,7 až 2,6 řádu o 4,9 až 5,5 řádu. Avšak na rozdíl

od kmene I nepřežily okyselování v množství 0,5 až 0,6 řádu.

Kyselina chlorovodíková inhibovala za stejných podmínek kmeny II a III intenzivněji než kyselina vin-

III. Vliv kyselin na *S. enteritidis* v subMIK koncentraci (%) ve vztahu k počtu buněk – The effect of acids on *S. enteritidis* at subMIC concentration (%) in relation to cell counts

Kyselina (%)	Číslo ředění ⁷	Čas ⁸ (h)	Log počtu salmonel v 1 ml (diference) ⁹		
			Kmen I ¹⁰	Kmen II ¹¹	Kmen III ¹²
Citronová ² (0,1) pH 4,6	5	0	2,78	2,87	2,59
	5	24	4,76 (+1,98)	4,93 (+2,06)	4,46 (+1,87)
	6	0	1,99	2,15	1,93
	6	24	3,71 (+1,72)	3,84 (+1,69)	3,65 (+1,72)
	7	0	1,26	1,26	1,0
	7	24	2,94 (+1,68)	2,77 (+1,51)	2,72 (+1,72)
Octová ³ (0,05) pH 5,0	3	0	4,62	4,94	4,56
	3	24	3,28 (-1,34)	3,28 (-1,66)	3,23 (-1,33)
	4	0	3,49	3,71	3,41
	4	24	2,66 (-0,83)	2,57 (-1,14)	0
	5	0	2,75	2,77	NT*
	5	24	0	0	NT
Vinná ⁴ (0,1) pH 4,5	5	0	2,53	2,62	2,45
	5	24	7,86 (+5,33)	7,92 (+5,30)	7,98 (+5,53)
	6	0	1,68	1,81	1,71
	6	24	6,79 (+5,11)	6,73 (+4,92)	6,65 (+4,94)
	7	0	0,30	0,60	0,48
	7	24	6,04 (+5,74)	0	0
Propionová ⁵ (0,05) pH 5,0	5	0	2,62	2,70	2,65
	5	24	5,95 (+3,33)	5,96 (+3,26)	5,53 (+2,88)
	6	0	1,78	1,83	1,83
	6	24	5,04 (+3,26)	5,62 (+3,79)	3,28 (+1,45)
	7	0	0,48	0,48	0,60
	7	24	4,87 (+4,39)	3,28 (+2,80)	2,99 (+2,39)
	5	0	2,30	3,04	2,30
Chlorovodíková ⁶ (0,025) pH 4,6	5	24	3,11 (+0,81)	2,04 (-1,0)	1,30 (-1,0)
	6	0	1,70	2,04	1,48
	6	24	2,99 (+1,29)	0,70 (-1,34)	1,40 (-0,08)
	7	0	0,50	1,30	0,60
	7	24	0	0,48 (-0,82)	0

* netestováno – not tested

For 1–6 see Tab. I; for 7–12 see Tab. II

ná, neboť zredukovala výchozí počty 2,3 až 3,0 řády kultur obou kmenů o jeden řád. Všechny tři kmeny byly výrazně inhibovány 0,05% kyselinou octovou. Inhibice se projevila redukcí výchozího počtu salmonel 4,6 až 4,9 řádu po okyselení o 1,3 až 1,7 řádu. Na rozdíl od ostatních, kyselina octová v subMIK působila germicidně na kmeny *S. enteritidis* v denzitě buněk 2,8 až 3,4 řádu.

DISKUSE

Citlivost salmonel k různým kyselinám je různá. Za optimálních podmínek se mohou salmonely množit i při pH 4,05, což je hraniční hodnota při použití kyseliny

chlorovodíkové, která plní funkci antimikrobiálního faktoru v žaludku člověka. Organické kyseliny mají hranici pH pro růst bakterií vyšší, např. kyselina mléčná 4,4, kyselina glutarová 4,7, kyselina octová 5,4 a kyselina propionová 5,5 (Chung a Goepfert, 1970).

V naší práci jsme se formou modelové studie zaměřili na detailnější analýzu vztahu mezi účinky vybraných čtyř organických a jedné anorganické kyseliny a počtem okyselovaných buněk salmonel v laboratorním médiu. Cílem práce bylo objasnit shodu resp. variabilitu vzniklou při okyselování tří kmenů *S. enteritidis* v závislosti na druhu kyselin, na koncentraci, tj. MIK a subMIK, ale zejména na počtu buněk.

V našich pokusech bylo zjištěno, že kmeny *S. enteritidis* v počtech 6 až 8 řádů byly inhibovány organické

kými kyselinami v koncentračním rozpětí MIK od 0,1 do 0,2 % s rozpětím pH od 3,8 do 4,6. Kyselina chlorovodíková, která plní funkci gastrické bariéry proti infekci, zastavila množení salmonel již při MIK 0,05 % (pH 3,6). Germicidní účinek na salmonely v počtu 8 řádů nastal při působení 0,4% roztoků organických kyselin s rozpětím pH od 3,3 do 3,9 a 0,1 % kyseliny chlorovodíkové (pH 2,5).

Pokud se týká intenzity působení kyselin v minimální inhibiční koncentraci na neředěné kultury *S. enteritidis*, tj. 7 až 8 řádů, charakterizované počtem usmrčených buněk salmonel lze demonstrovat jejich pořadí následovně: citronová < vinná < propionová < octová < chlorovodíková.

Inhibice kultur s denzitou 6 až 7 řádů probíhala v následujícím pořadí kyselin: propionová < vinná < chlorovodíková < citronová < octová.

Souhrně lze konstatovat, že z organických kyselin působila v MIK na *S. enteritidis* nejintenzivněji kyselina octová. Ještě intenzivněji však redukovala kultury salmonel v počtu 6 až 8 řádů kyselina chlorovodíková. Zajímavá skutečnost nastala při okyselování salmonel s denzitou 5 až 6 řádů. Zatímco organickými kyselinami byly buňky úplně devitalizovány (s výjimkou nejslabší kyseliny propionové), expozici anorganické kyseliny chlorovodíkové přežilo ještě bezmála tisíc buněk.

Mezi jednotlivými kmeny *S. enteritidis* nebyly statisticky prokázány rozdíly během působení kyselin v MIK. Ke kyselině octové vykazoval relativně největší citlivost kmen I, který byl izolován z pacienta.

Při sledování chování kmenů *S. enteritidis* v přítomnosti kyselin v subMIK koncentracích bylo zjištěno, že množení salmonel nebylo vůbec zastaveno u kultur s denzitou 5, 6, 7 a 8 řádů.

Kyseliny propionová a citronová nezabránily množení salmonel v počtu od 0,5 do 1,3 řádu. Při okyselování 0,1% kyselinou vinnou došlo ke stejné situaci u kultur v množství 1,7 až 2,6 řádu, avšak při naředění na 0,3 až 0,6 řádu přežil kmen I, zatímco kmeny II a III uhynuly.

Inhibiční účinky v subMIK byly zaznamenány pouze u kyseliny octové, která působila retardačně na všechny kmeny s denzitou menší nebo rovnou 4,9 řádu, nejvíce však na kmen III (izolát z vejce). Kyselině chlorovodíkové odolával relativně nejvíce kmen I, u kterého inhibice nastala až tehdy, jestliže byla kultura naředěna na hodnotu 0,5 řádu. Naproti tomu kmeny II a III byly kyselinou chlorovodíkovou inhibovány v počtech vyšších než 3 řády.

V uvedené ekologické studii byla ověřena účinnost okyselování tří kmenů virulentního sérovaru *S. enteritidis* pomocí pěti vybraných kyselin. Výsledky této práce, která podává detailnější analýzu vztahu mezi okyselováním a počtem exponovaných buněk patogenního agens jsou obtížně srovnatelné s literárními údaji, neboť nejsou dostupné odborné práce se stejným nebo podobným cílem. Dosažené poznatky podporují koncept Chunga a Goepferta (1970) o tom, že minimální hodnotu pH, při které mohou salmonely růst a po-

množit se není možno přesně definovat vzhledem k vlivu ekologických faktorů jako jsou teplota inkubace, složení růstového média (potraviny) nebo druh sérovaru.

Výsledky této studie jsou v dobré korelaci s některými dřívějšími údaji, pokud se týkají vysoké antibakteriální účinnosti kyseliny octové v laboratorním médiu (např. El-Gazzar a Marth, 1992) nebo v majonéze, ve které tato kyselina v koncentraci 0,2 až 0,4 % způsobila rychlé odumírání *S. enteritidis* v počtu více než 5 řádů po 4 h při teplotě 21 °C (Růžičková, 1994).

Z hlediska prevence salmonelózy je významné zjištění, že efektivnost okyselování závisí nejen na typu kyselin a jejich stupni disociace, ale na velikosti inokula. Tato skutečnost je vysoce aktuální obzvláště v současné době, kdy dosud přijímaný koncept, že > 10⁵ salmonel je třeba k vyvolání klinických příznaků salmonelózy nemá konečnou platnost a na základě nových rozborů spíše k revizi.

Závěrem je třeba zdůraznit a podtrhnout, že z hlediska zamezení pomnožení salmonel v potravinách okyselováním je nezbytné, aby kyselost působila po určitou dobu a rovnoměrně v celém obsahu potraviny.

LITERATURA

- EL-GAZZAR, F. E. – RUSUL, G. – MARTH, E. H.: Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of lactic acid and at different initial pH values. *J. Food Protec.*, 50, 1987: 940.
- EL-GAZZAR, F. E. – MARTH, E. H.: Dairy foods, *Salmonellae*, salmonellosis, and dairy foods: A Review. *J. Dairy Sci.*, 75, 1992: 2327–2343.
- GERIGK, K.: WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe. In: Proc. Congr. Foodborne infections and intoxications. Berlin, 1992: 20–25.
- HUNTER, D. R. – SEGEL, I. H.: Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: Evidence for a proton or charge gradient as the driving force. *J. Bacteriol.*, 113, 1973: 1184–1192.
- CHUNG, K. C. – GOEPFERT, J. M.: Growth of *Salmonella* at low pH. *J. Food Sci.*, 35, 1970: 326–328.
- INGRAM, M. – OTTOWAY, F. J. H. – COPPOCK, J. B.: The preservative action of acid substance in food. *Chem. Ind. (London)*, No. 42, 1956: 1154–1163.
- ST. LUISE, M. E. – MORSE, D. L. – POTTER, M. E.: The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. *J. Amer. Med. Assoc.*, 259, 1988: 2103–2107.
- MACRIS, B. J.: Mechanisms of benzoic acid uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol.*, 30, 1975: 503–506.
- MATOUŠKOVÁ, O. – CHALUPA, J. – CIGLER, M. – HRUŠKA, K.: Statistický a grafický systém STAT Plus verze 1.01 – uživatelská příručka. Brno. Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1992. 168 s.
- MATYÁŠ, Z.: K účinné prevenci nálezů a otrav z potravin. *Výživa lidu*, XLV, 1990: 50–51.

- MATYÁŠ, Z.: Aktuální problematika salmonelóz u nás i v zahraničí. *Prům. Potravn.*, 1993: 10–14.
- MORSE, D. L. – BIRKHEAD, G. S. – GUARDINO, J. – KONDRACKI, S. F. – GUZEWICH, J. J.: Outbreak and sporadic egg-associated cases of *Salmonella enteritidis*: New York's experience. *Amer. J. Publ. Hlth*, 84, 1994: 859–860.
- PEGUES, D. A. – MILLER, S. I.: Salmonellosis, including typhoid fever. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 7, 1994: 616–623.
- ROSICKÝ, B. – SIXL, W. – BENEŠ, Č. – HAVLÍK, J. – HUBÁLEK, Z. – LÁT, J. – MATYÁŠ, Z. – MIKULÁŠKOVÁ, M. – SIXL-VOIGHT, B. – THIEL, W. – WOLF, A.: Salmonelózy – aktuální informace pro lékaře, veterinární lékaře a potravinářskou praxi. *Scientia Med. (Praha)*, 1994. 170 s.
- RŮŽICKOVÁ, V.: Growth and survival of *Salmonella enteritidis* in selected egg foods. *Veter. Med.-Czech*, 39, 1994: 187–195.
- ŠRAMOVÁ, H. – BENEŠ, Č.: Salmonelózy v České republice v letech 1989–1993. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 43, 1994: 47–54.
- URBÁŠKOVÁ, P. – HAUSNEROVÁ, S. – CHALOUPECKÝ, V. – LOCHMANOVÁ, J. – VÝMOLA, F. – ZAHRADNICKÝ, J.: Vyšetření pro antimikrobiální terapii. Praha, Avicenum 1985. 150 s.
- ČSN 56 0088. Potravinářské výrobky. Průkaz bakterií rodu *Salmonella*. 1987. 17 s.
- ČSN 56 0100. Mikrobiologické zkoušení poživatin předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozoven. 1970. 239 s.

Došlo 9. 8. 1995

Kontaktní adresa:

RNDr. Vladislava R ů ž i č k o v á, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29

Ústav vědeckých a potravinářských informací Praha

vydává

z pověření České akademie zemědělských věd celkem 10 vědeckých časopisů, které uveřejňují původní vědecké práce o výzkumných úkolech v odvětví zemědělství, potravinářství a lesnictví, vědecká pojednání, studie a přehledy zahraniční literatury o vědeckých problémech. Časopisy jsou určeny především pracovníkům výzkumné základny, vysokých škol, vedoucím pracovníkům, odborníkům ve šlechtitelství a semenářství, plemenářství, ochraně rostlin, veterinářství, vývojových pracovištích zemědělské techniky, zemědělských staveb aj.

Rostlinná výroba (*Plant Production*)

Měsíčník, formát A4, počet stran 48, předplatné: celoroční Kč 588,-, jednotlivá čísla Kč 49,-

Živočišná výroba (*Animal Production*)

Měsíčník, formát A4, počet stran 48, předplatné: celoroční Kč 588,-, jednotlivá čísla Kč 49,-

Zemědělská ekonomika (*Agricultural Economics*)

Měsíčník, formát A4, počet stran 48, předplatné: celoroční Kč 588,-, jednotlivá čísla Kč 49,-

Lesnictví – Forestry

Měsíčník, formát A4, počet stran 48, předplatné: celoroční Kč 588,-, jednotlivá čísla Kč 49,-

Veterinární medicína (*Veterinary Medicine – Czech*)

Měsíčník, formát A4, počet stran 32, předplatné: celoroční Kč 492,-, jednotlivá čísla Kč 41,-

Potravinářské vědy (*Food Sciences*)

Dvoutměsíčník, formát A5, počet stran 80, předplatné: celoroční Kč 264,-, jednotlivá čísla Kč 44,-

Zemědělská technika (*Agricultural Engineering*)

Čtvrtletník, formát A4, počet stran 40, předplatné: celoroční Kč 176,-, jednotlivá čísla Kč 44,-

Ochrana rostlin (*Plant Protection*)

Čtvrtletník, formát A5, počet stran 80, předplatné: celoroční Kč 176,-, jednotlivá čísla Kč 44,-

Genetika a šlechtění (*Genetics and Plant Breeding*)

Čtvrtletník, formát A5, počet stran 80, předplatné: celoroční Kč 176,-, jednotlivá čísla Kč 44,-

Zahradnictví (*Horticultural Science*)

Čtvrtletník, formát A4, počet stran 32, předplatné: celoroční Kč 176,-, jednotlivá čísla Kč 44,-

Objednávku zašlete na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací
Slezská 7
120 56 Praha 2

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 imprimované vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením všech autorů, že se zveřejněním souhlasí.

Rozsah původních prací nemá přesahovat 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 textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořízenou na PC s uvedením použitého programu. 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 zkratk nepoužívat.

Název práce (titul) nemá přesahovat 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 informace, 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 with the paper text or graphical documentation should be provided with the paper manuscript, indicating the used editor program. 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.

VETERINARY MEDICINE – CZECH

Volume 41, No. 1, January 1996

CONTENTS

Eissa H. M., El-Belely M. S.: Gonadotrophin releasing hormone treatment of Holstein cows with follicular cysts monitored by skim milk progesterone determination	1
Paulík Š., Mojžíšová J., Bajová V., Baranová D., Paulíková I.: Evaluation of canine lymphocyte blastogenesis prior and after <i>in vitro</i> suppression by dog demodicosis serum using ethidium bromide fluorescence assay	7
Borošková Z., Šoltýs J., Benková M.: Effect of copper on the immune responses of guinea pigs with experimental ascariasis.....	13
Páčová Z., Vyhnálková J., Lukášová J., Holec J.: Identification of aerobic and facultatively anaerobic sporulating bacteria isolated from operations of milk primary production	19
Růžičková V.: Effects of acidification on <i>Salmonella enteritidis</i> in a defined medium.....	25

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 41, č. 1, Leden 1996

OBSAH

Eissa H. M., El-Belely M. S.: Aplikace GnRH dojnícím holštýnského plemene s folikulárními cystami monitorovanými stanovením progesteronu v mléce.....	1
Paulík Š., Mojžíšová J., Bajová V., Baranová D., Paulíková I.: Hodnotenie blastogenézy lymfocytov psov pred supresiou <i>in vitro</i> a po nej pomocou séra od demodikózných psov pri použití fluorescenčného testu s ethidium bromidom	7
Borošková Z., Šoltýs J., Benková M.: Vplyv medi na imunitné prejavy morčiat pri experimentálnej askarióze.....	13
Páčová Z., Vyhnálková J., Lukášová J., Holec J.: Identifikace aerobních a fakultativně anaerobních sporulujících bakterií izolovaných z prvovýroby mléka.....	19
Růžičková V.: Vliv okyselování na <i>Salmonella enteritidis</i> v definovaném médiu	25

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41, fax: 02/25 70 90 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Bf. Nejedlých 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1996

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 7, 120 56 Praha 2